

Université de Montréal

**Effet de la RNase HI sur l'expression génique et sur le surenroulement de
l'ADN chez *Escherichia coli***

Par

Flora Nolent

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc)

En Microbiologie et Immunologie

Janvier 2010

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

©Flora Nolent

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire de maîtrise est intitulé :

**Effet de la RNase HI sur l'expression génique et sur le surenroulement de
l'ADN chez *Escherichia coli***

Présentée par :
Flora Nolent

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

-Président rapporteur : Dr. France Daigle
Directeur de recherche : Dr. Marc Drolet
Membre du jury: Dr. Georges Szatmary

Mémoire accepté le:

Résumé

Les R-loops générés durant la transcription sont impliqués dans de nombreuses fonctions incluant la réplication, la recombinaison et l'expression génique tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Plusieurs études ont montré qu'un excès de supertours négatifs et des séquences riches en bases G induisent la formation de R-loops.

Jusqu'à maintenant, nos résultats nous ont permis d'établir un lien direct entre les topoisomérases, le niveau de surenroulement et la formation de R-loops. Cependant, le rôle physiologique des R-loops est encore largement inconnu.

Dans le premier article, une étude détaillée du double mutant *topA rnhA* a montré qu'une déplétion de RNase HI induit une réponse cellulaire qui empêche la gyrase d'introduire des supertours. Il s'agit ici, de la plus forte évidence supportant les rôles majeurs de la RNase HI dans la régulation du surenroulement de l'ADN.

Nos résultats ont également montré que les R-loops pouvaient inhiber l'expression génique. Cependant, les mécanismes exacts sont encore mal connus. L'accumulation d'ARNs courts au détriment d'ARNs pleine longueur peut être causée soit par des blocages durant l'élongation de la transcription soit par la dégradation des ARNs pleine longueur.

Dans le deuxième article, nous montrons que l'hypersurenroulement négatif peut mener à la formation de R-loops non-spécifiques (indépendants de la séquence nucléotidique). La présence de ces derniers, engendre une dégradation massive des ARNs et ultimement à la formation de protéines tronquées.

En conclusion, ces études montrent l'évidence d'un lien étroit entre la RNase HI, la formation des R-loops, la topologie de l'ADN et l'expression génique. De plus, elles attestent de la présence d'un nouvel inhibiteur de gyrase ou d'un mécanisme encore inconnu capable de réguler son activité. Cette surprenante découverte est élémentaire sachant que de nombreux antibiotiques ciblent la gyrase. Finalement, ces études pourront servir également de base à des recherches similaires chez les cellules eucaryotes.

Mots clés : Topoisomérase I, gyrase, RNase HI, R-loops, surenroulement.

Abstract

R-loops generated during transcription elongation are implicated in many DNA reactions, including replication, recombination and gene expression both in prokaryotes and in eukaryotes. Many studies have shown that negative supercoils excess and G-rich sequences induce the formation of R-loops.

Up to now, our results allow us to establish a direct link between topoisomerases, supercoiling level, and the formation of R-loops. However, what the physiological significance, if any, of R-loops is still largely unknown.

In the first article, a detailed study on double *topA rnhA* mutants showed that the depletion of RNase HI activity induces a cellular response which renders gyrase unable to perform supercoils. This is the first evidence implicating RNase HI as a major player in DNA supercoiling regulation.

Our results also show that R-loops formation can lead to the inhibition of gene expression. However, the exact mechanism(s) leading to the inhibition of gene expression are not yet understood. The accumulation of shorter than full length RNAs could be caused by road-blocks during transcription elongation or by the degradation of full length RNAs.

In the second article, we show that hypernegative supercoiling can lead to sequence independent R-loop formation. The physiological consequence is extensive RNA degradation which ultimately culminates in the formation of truncated proteins.

In conclusion, this study clearly shows a close link between RNase HI activity, R-loop formation, DNA topology and gene expression. In addition, this study also provides some evidence for the synthesis of a gyrase inhibitor that can regulate gyrase activity directly or indirectly via unidentified mechanisms. This surprising observation is still preliminary taking into consideration that many antibiotics target gyrase. Finally results from this study could open up avenues for research in eukaryotes.

Key words : Topoisomerase I, gyrase, RNase HI, R-loops, supercoiling.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	x
 I. Introduction.....	 1
I.1. Propriétés topologiques de l'ADN.....	3
I.1.1 Le surenroulement de l'ADN chez les organismes vivants.....	4
I.1.2 Surenroulement global.....	7
I.1.3 Surenroulement local.....	9
 I.2. Les topoisomérases	 11
I.2.1 Les topoisomérases de type IA.....	14
a) La topoisomérase I.....	14
b) La topoisomérase III.....	15
I.2. 2 Les topoisomérases de type II.....	16
a) La gyrase.....	17
b) La topoisomérase IV.....	18
 I.3. Les R-loops.....	 20
I.3.1 Facteur influençant la formation des R-loop.....	20
a) Le surenroulement : transcription et excès de surenroulement négatif chez le mutant <i>topA</i> -.....	20
b) La richesse en bases G.....	23

i. Chez les eucaryotes.....	23
ii. Chez les procaryotes.....	27
iii. Autre structure : les G-loops.....	27
c) Stimulation des R-loop par un stress chez les mutants <i>topA</i> -.....	29
d) Le découplage transcription/traduction chez les procaryotes et le découplage transcription/épissage chez les eucaryotes.....	30
i. Chez les procaryotes.....	30
ii. Chez les eucaryotes.....	32
e) Interaction protéine-ADN chez les eucaryotes : la coiffe.....	34

I.3.2 Propriétés des R-loop chez les eucaryotes et les procaryotes.....35

a) Amorces pour la réplication.....	35
i. Chez les procaryotes : réplication des plasmides ColE1.....	35
ii. Réplication mitochondriale chez les eucaryotes.....	38
b) Instabilité génomique.....	39
i. Chez la levure.....	39
ii. Chez les eucaryotes supérieurs.....	40
c) Le changement de classe des chaînes lourdes des immunoglobulines (μ) pour d'autres isotypes de chaînes lourdes (γ pour les IgG, α pour les IgA et ϵ pour les IgE) par recombinaison chez les lymphocytes B matures.....	41
d) Inhibition de l'expression génique durant l'élongation de la transcription.....	42

II. Résultats.....	45
II. 1. “Hypernegative supercoling inhibits growth by causing RNA degradation” par Baaklini et <i>al.</i>, 2008.....	46
II. 2. « Depletion of RNase HI activity in <i>Escherichia coli</i> lacking DNA topoisomerase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation” par Usongo et <i>al.</i>, 2008.....	85
IV. Discussion.....	128
V. Références bibliographiques.....	142
VI. Annexes.....	177
VII. Remerciements.....	180

Liste des tableaux

Dans la section III. Résultats

III. 1. “Hypernegative supercoiling inhibits growth by causing RNA degradation” par Baaklini et *al.*, 2008

“Table 1. *Escherichia coli* strains used in this study”74-75

III. 2.« Depletion of RNase HI activity in *Escherichia coli* lacking DNA topoisomerase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation” par Usongo et *al.*, 2008

“Table 1. *Escherichia coli* strains used in this study”114-115

Liste des figures

Dans la section I. Introduction

Figure 1. Images progressives prises au microscope à force atomique montrant la compaction de l'ADN dans une levure.....	2
Figure 2. Propriétés du surenroulement	4
Figure 3. Photographie prise au microscope électronique d'un plasmide de 9 Kb sous forme relaxé et surenroulé.....	5
Figure 4. Représentation schématique du rôle des « histone like protein » dans le maintien du surenroulement de l'ADN.....	6
Figure 5. Représentation schématique du chromosome d' <i>E. coli</i>	8
Figure 6. Photographie de l'organisation du chromosome d' <i>E. coli</i> en domaines topologiques.....	8
Figure 7. Représentation schématique du chromosome d' <i>E. coli</i> organisé en domaines topologiques.....	9
Figure 8. Représentation schématique du « Twin Domain Model » proposé par Liu et Wang.....	10
Figure 9. Réactions catalysées par les topoisomérases.....	12
Figure 10. Actions des topoisomérases sur la topologie de l'ADN.....	13
Figure 11. Représentation schématique du mécanisme d'action des topoisomérases de type IA.....	14
Figure 12. Représentation schématique du mécanisme d'action des topoisomérases de type II.....	17
Figure 13. Représentation schématique des 2 types de R-loop possibles.	20
Figure 14. Proposition de structures générées durant la commutation de classe des immunoglobulines.....	24
Figure 15. Formation d'un G-loop durant la transcription d'une région riche en Guanine.....	28

Figure 16. Modèle de formation des tétrades de guanine par des liaisons hydrogènes de type Hoogsteen	28
Figure 17. Représentation schématique du couplage transcription/traduction chez les procaryotes.....	30
Figure 18. Représentation schématique de la formation d'un R-loop lors d'un découplage transcription-traduction chez les procaryotes.....	32
Figure 19. Représentation schématique de la formation co-transcriptionnelle de R-loops chez des cellules déficientes en ASF/ASF2.....	33
Figure 20. Mécanisme cSDR chez les mutants <i>rnhA</i>	37
Figure 21. Modèle proposé du mécanisme de blocage de l'élongation de la transcription par des R-loop.....	43

Dans la section III. Résultats

III. 1. “Hypernegative supercoiling inhibits growth by causing RNA degradation” par Baaklini et *al.*, 2008

Figure 1. “Correlation between hypernegative supercoiling and growth inhibition after temperature downshifts”.....	76-77
Figure 2. “Association of <i>yhdG</i> and <i>fis</i> mRNAs with ribosomes after a temperature downshift”.....	78
Figure 3. “Association of <i>crp</i> mRNAs with ribosomes after a temperature downshift”.....	79
Figure 4. “Protein synthesis after a temperature downshift”.....	80
Figure 5. “Expression and processing of <i>fis</i> mRNAs after a temperature downshift”.....	81
Figure 6. “Expression and processing of <i>lac</i> mRNAs after a temperature downshift”.....	82
Figure 7. “The effects of <i>rneA14</i> and spectinomycin on the processing of <i>lacA</i> mRNAs after a temperature downshift”.....	83

Figure 8. “R-loop formation on hypernegatively supercoiled templates <i>in vitro</i> ”	84
-----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

III. 2. « Depletion of RNase HI activity in *Escherichia coli* lacking DNA topoisomerase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation” par Usongo et al., 2008

Figure 1. “Supercoiling in a <i>topA rnhA</i> null double mutant”	116-117
Figure 2. “Supercoiling in a <i>topA rnhA</i> null double mutant after transcription inhibition”	118
Figure 3. “Western blot analysis to measure topoisomerase IV and gyrase levels in <i>topA rnhA</i> mutants”	119
Figure 4. “Complementation of a <i>topA rnhA</i> mutant by topoisomerase III overproduction”	120
Figure 5. “Topoisomerase IV inhibition does not promote hypernegative supercoiling in a double <i>topA rnhA</i> mutant”	121
Figure 6. “GyrI, a gyrase inhibitor, plays no role in supercoiling inhibition in a <i>topA rnhA</i> null double mutant”	122
Figure 7. “Supercoiling assays in crude cell extracts”	123-124
Figure 8. “Topoisomerase III overproduction does not change supercoiling in a <i>topA rnhA</i> null double mutant “	125
Figure 9. “DAPI staining of <i>topA rnhA</i> null mutants reveals segregation defects that are corrected by topoisomerase III overproduction”	126-127

Dans la section V. Annexes

Figure 1. Matrice d’ADN utilisées pour la transcription <i>in vitro</i>	178
Figure 2. Transcription <i>in vitro</i> de pJP461 avec différentes densité de surenroulement négatif	179

Liste des abréviations

A

A : adénine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

AP : ampicilline

AP^R : résistant à l'ampicilline

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomal

ARNt : ARN de transfert

ATP : adenosine triphosphate

C

C : cytosine

CaCl₂ : chlorure de calcium

Cm : chloramphénicol

Cm^R : résistant au chloramphénicol

cSDR : « constitutive Stable DNA Replication »

C-terminal : carboxy-terminal

CTD : Cytidine déaminase

°C : degrés celsius

D

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

Δ : délétion (delta)

σ : densité de surenroulement (sigma)

E

E. coli : *Escherichia coli*

F

Fig : figure

G

G : guanine

GMP : Guanosine monophosphate

GTP : Guanosine triphosphate

H

H : heure (s)

I

Ig : Immunoglobuline

IPTG : isopropylthio- β -D-galactoside

K

Kb : kilobase (s)

kDa : kiloDalton (s)

Km : kanamycine

Km^R : resistant à la kanamycine

M

Mg²⁺ : ion magnésium

μg : microgramme (s)

μl : microlitre (s)

μM : micromolaire

mg : milligramme (s)

ml : millilitre (s)

mM : millimolaire

min : minute (s)

N

ng : nanogramme (s)

N-terminale : amino-terminal

P

P : page

Pb : paire de bases

PCR : « polymerase Chain Reaction »

ppGpp : guanosine tétraphosphate

R

RNAP : « RNA polymerase »

RNase : ribonucléase

rrn : opéron de l'ARN ribosomique

S

SSB : « Single Stranded DNA Binding protein »

T

T : thymine

Tc : tétracycline

Tc^R : résistant à la tétracycline

Ts : thermosensible

U

UV : ultraviolet

I. Introduction

L'ADN est une molécule que l'on retrouve chez tous les organismes vivants. Support universel de l'information génétique, sa taille varie beaucoup d'un organisme à l'autre. Chez les eucaryotes, l'ADN est fragmenté en plusieurs molécules linéaires appelées chromosomes retrouvés essentiellement dans le noyau cellulaire délimité par une enveloppe ainsi que pour une faible part, dans des organites cytoplasmiques comme les mitochondries et les chloroplastes. Parmi les eucaryotes, on retrouve de petits génomes comme celui de la levure *Saccharomyces cerevisiae* mais aussi des génomes plus grands comme celui de la mouche *Drosophila melanogaster* et celui de l'humain. Chez les procaryotes, chaque cellule possède généralement un seul chromosome circulaire et fermé de manière covalente. Contrairement aux eucaryotes, le chromosome est libre dans le cytoplasme. Sa taille varie considérablement entre les espèces, environ 4 Mb (1,4 mm) pour *Escherichia coli* et 12 Mb (4 mm) pour la bactérie du sol *Sorangium cellulosum* (Pradella et al., 2002). Finalement, la taille d'une cellule est toujours plus petite que celle de l'ADN qu'elle renferme. Une compaction de celui-ci est donc impératif. Cette condensation se fait via un mécanisme de surenroulement dont la viabilité des cellules dépend.

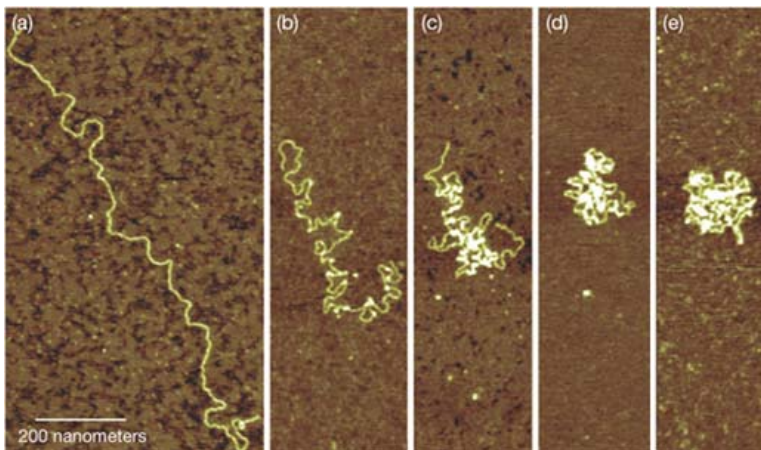


Figure 1 : (a–e) Images progressives prises au microscope à force atomique montrant la compaction de l'ADN dans une levure (<http://www.llnl.gov/str/May04/DeYoreo.html>)

Des études menées sur des cellules possédant des mutations dans les gènes codant pour les topoisomérases ont démontré l'importance du maintien précis du surenroulement dans la viabilité cellulaire. Les topoisomérases sont des enzymes capables de modifier le nombre de supertours dans une molécule d'ADN double brin. De plus, d'autres facteurs influencent grandement la topologie de l'ADN et donc son accessibilité aux machineries des divers processus biologiques : les structures nucléoprotéiques en général, la séquence nucléotidique et les processus cellulaires eux-mêmes comme la réplication, la transcription, la recombinaison homologue et la ségrégation des chromosomes.

I.1. Propriétés topologiques de l'ADN

La topologie d'une molécule d'ADN se définit par l'équation suivante : $Lk = T + W$. Le « Linking number » ou nombre d'enlacements (Lk) est une propriété importante de la molécule d'ADN. Il définit le nombre de fois que le 1^{er} brin traverse l'autre brin lorsque la molécule d'ADN est étendue sur un seul plan. Le Lk est toujours constant à moins qu'une liaison phosphodiester soit clivée chimiquement ou par une enzyme. Le « Twist » ou torsion (T) correspond au nombre de tours d'hélice. Le « writhing number » ou vrillage (W) définit l'état de surenroulement dans l'espace de la molécule d'ADN c'est-à-dire le nombre de fois où la double hélice se croise elle-même. Puisqu'en moyenne il y a 10,5 pb par tour d'hélice, une molécule d'ADN relaxée aura un « Linking number » identique au nombre de torsions ($Lk = T$ et $W = 0$) (figure 2A). Le « Linking number » est alors appelé L_0 et se définit comme suit : $L_0 = N / 10,5$ où N correspond à la taille en paire de bases. Cette règle est également valable pour les molécules d'ADN linéaires où les extrémités sont libres. L'introduction de 1 supertour négatif dans une molécule circulaire relaxée change la valeur du vrillage en -1 (figure 2B) donc pour un ADN surenroulé négativement, W est toujours négatif. Un ADN est dit surenroulé négativement lorsqu'il s'enroule dans le sens contraire de son hélicité. Le surenroulement négatif favorise l'ouverture des brins. Lorsque l'ADN s'enroule dans le sens de son hélicité, on parle de surenroulement positif. Ce dernier crée des tensions dans la double hélice ce qui empêche la séparation des brins.

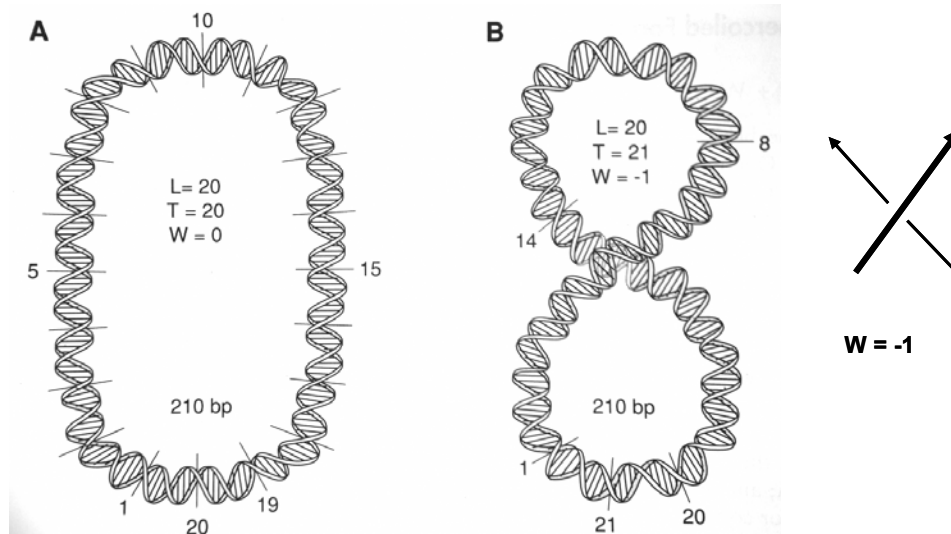


Figure 2 : Propriétés du surenroulement. (A) ADN circulaire, fermé et relaxé ($W=0$) de 210pb possédant 20 tours d'hélice ($210 \div 10,5$). (B) Même plasmide avec 1 supertour négatif ($W = -1$). Sinden, 1994, p 100.

Deux molécules d'ADN circulaires ayant le même nombre de nucléotides, une séquence identique mais qui diffèrent entre eux uniquement par leur nombre d'enlacements (Lk) sont appelées topoisomères.

Un autre paramètre du surenroulement est la densité de surenroulement (σ) qui permet de déterminer la moyenne du nombre de supertours pour chaque tour d'hélice dans une molécule d'ADN donnée. La densité de surenroulement σ est définie par l'équation : $\sigma = \Delta Lk / Lk_0 = Lk - Lk_0 / Lk_0$. *In vivo*, l'ADN surenroulé négativement chez les cellules procaryotes est situé entre -0,05 et -0,06 (Bauer et *al.*, 1980, Drlica et Rouviere-Yaniv., 1987, Pettijohn., 1996).

I.1.1 Le surenroulement de l'ADN chez les organismes vivants

L'ADN est formé de deux brins polynucléotides antiparallèles associés entre eux par des liaisons hydrogènes s'enroulant autour d'un axe commun pour former une double hélice. Un appariement très spécifique induit cette complémentarité entre les 2 brins. La double hélice s'enroule à son tour dans l'espace pour former de l'ADN dit surenroulé. Chez la majorité des organismes vivants, l'ADN est surenroulé négativement.

Le surenroulement négatif joue un rôle primordial dans le mécanisme de condensation du chromosome (figure 3a, b). Il favorise l'ouverture des brins d'ADN nécessaire aux fonctions cellulaires telles que la réplication, la transcription (Funnell et *al.* 1986; Pruss et Drlica 1989). La topologie de l'ADN est différente entre les espèces et dépend également des facteurs environnementaux. Son maintien est primordial pour la viabilité des cellules (Gellert et *al.*, 1976; Pruss et *al.*, 1982; DiNardo et *al.*, 1982). Si une cassure simple ou double brin survenait, des supertours seraient perdus. Une faible réduction du surenroulement négatif dans la cellule peut être létale (Wang., 1985; Zechiedrich et *al.* 1997). Un ADN est dit relaxé lorsqu'un ADN circulaire et fermé de manière covalente ne contient aucun supertour (figure 3)

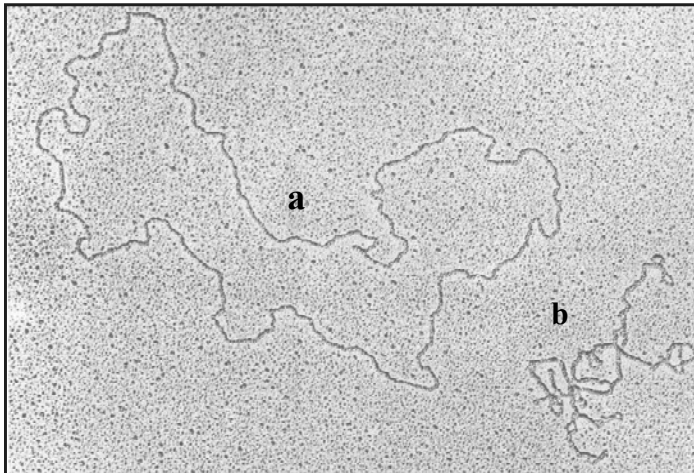


Figure 3 : Photographie prise au microscope électronique d'un plasmide de 9 Kb sous forme relaxé (a) et surenroulé (b). Sinden, 1994; p 98.

Naturellement, l'ADN n'est pas toujours nu dans la cellule. Il arrive fréquemment que ce dernier soit emprisonné par des protéines de type histone de manière à générer du surenroulement dit toroïdal. Ces complexes ADN-protéines sont présents à la fois chez les procaryotes et chez les eucaryotes et influencent la topologie de l'ADN. Lorsque l'ADN est libéré de ces protéines, on parle de surenroulement plectonémique.

En 1976, Griffith visualisait au microscope électronique le chromosome bactérien d'*Escherichia coli* et observait la présence de protéines fixées à l'ADN tel qu'observé sur la chromatine eucaryote. L'isolation du chromosome bactérien associé aux protéines en présence d'une basse concentration en sels et d'un agent stabilisateur puis la séparation de ces protéines du nucléoïde via un gradient de sucrose (Kornberg et *al.*, 1974; Murphy et Zimmerman., 1997a et b) a permis d'identifier 5 protéines principales qui sont HU,

H-NS, IHF, Fis et StpA. Ces protéines appartiennent à la famille des « histone-like » car leur structure ainsi que leurs propriétés à se fixer à l'ADN sont différentes des histones eucaryotes. Le complexe ADN-protéine est moins stable que chez les eucaryotes (Broyles et Pettijohn., 1986). En moyenne, la moitié des supertours du chromosome bactérien sont contraints (ADN toroïdal) permettant ainsi de participer au maintien du surenroulement global de l'ADN en prévenant une éventuelle relaxation due à des cassures (figure 4).

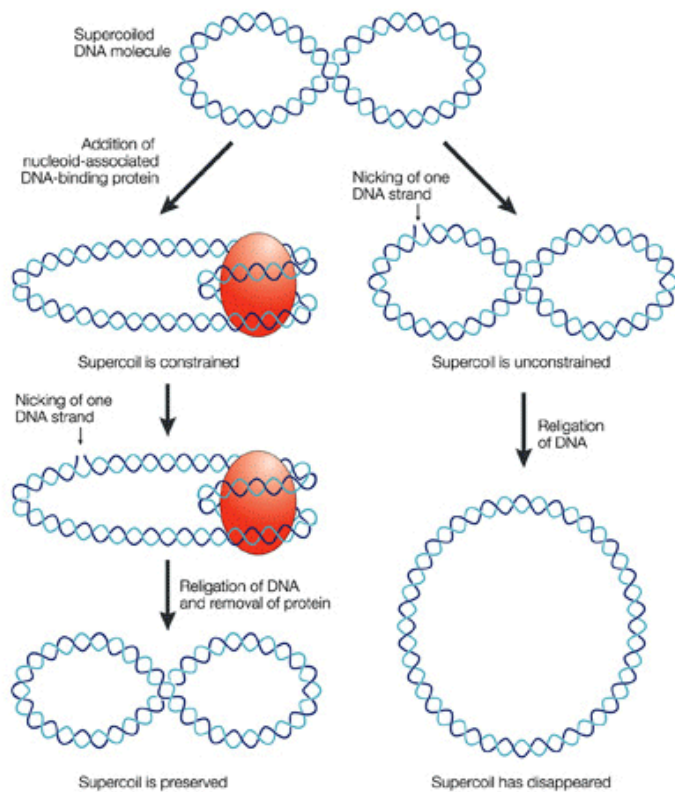


Figure 4 : Représentation schématique du rôle des « histone like protein » dans le maintien du surenroulement de l'ADN. Dorman., 2004.

Certaines de ces protéines comme IHF reconnaissent spécifiquement une ou plusieurs séquences d'ADN (Goodrich et *al.*, 1990). La protéine Fis est capable de reconnaître plusieurs séquences d'ADN avant de s'y fixer mais d'autres études ont démontré également que dans certaines conditions, Fis est capable de se fixer à une portion d'ADN courbé indépendamment de sa séquence (Bétermier et *al.*, 1994, Pan et *al.*, 1996). La fixation de la protéine HU ne dépend pas de la séquence. Elle reconnaît entre autre l'ADN courbé comme l'ADN impliqué dans les jonctions de hollidays (Pontiggia et *al.*, 1993), les cassures simple brin et les délétions de 1 ou 2 nucléotides (gap) (Castaing et *al.*, 1995) ainsi que les ADN cruciformes (Bonnefoy et *al.*, 1994).

H-NS et StpA sont homologues (Zhang et Belfort., 1992, Dorman., 2004). Ils sont capables d'interagir ensemble (Sonden et Uhlin., 1996) et reconnaissent plus généralement une portion d'ADN courbée allant globalement de 10 à 35 bp.

Il est désormais clairement établi que le nombre de ces protéines par cellule ainsi que leur fixation sur le chromosome diffèrent selon l'état physiologique cellulaire (Ali Azam et *al.*, 1999). Ces protéines sont en partie responsables du surenroulement de l'ADN, de la condensation et de la structure dans l'espace du chromosome bactérien. Cependant, elles interviennent également plus directement dans divers processus comme la réplication, la recombinaison et la réparation de l'ADN soumis aux UV et aux rayons γ (Boubrick et Rouvière-Yaniv., 1995). Elles interviennent également dans la régulation de la transcription (Blot et *al.*, 2006), dans la mutation adaptative de certains gènes durant la croissance (Williams et Foster., 2007) et dans la partition des chromosomes durant la division cellulaire (Wada et *al.*, 1988, Kaidow et *al.*, 1995). Chez les procaryotes, environ la moitié des supertours du chromosome sont contraints par ces protéines (Bliska et Cozzarelli, 1987).

I.1.2 Surenroulement global

En 1972, Worcel et Burgi ont analysé le chromosome d'*Escherichia coli* par une technique de sédimentation reflétant son niveau de surenroulement. Après un traitement limité à la DNase pour générer peu de cassures simples brins, ils ont remarqué que seule une partie du chromosome était relaxée et que le reste du chromosome conservait ses supertours. Une relaxation complète du chromosome était provoquée par un certains nombre de cassure simple brin.

Ils ont alors proposé un modèle dans lequel les boucles d'ADN seraient retenues via une structure stable et que l'interaction entre l'ADN et l'ARN stabiliserait et diviserait le chromosome en plusieurs boucles, empêchant ainsi la diffusion d'une relaxation à tout le chromosome (Worcel et Burgi., 1972) (figure 5). C'est en 1976 que Kavenoff et Bowen observaient pour la première fois au microscope électronique la présence de boucles sur le chromosome bactérien d'*E. coli*. Ces boucles semblaient être reliées entre elle par une structure centrale de nature stable et inconnue et qui contenait de l'ARN (figure 6). Le chromosome se trouvait ainsi divisé en plusieurs domaines

topologiques, ce qui supportait les travaux de Burgi et Worcel (Kavenoff et Bowen., 1976).

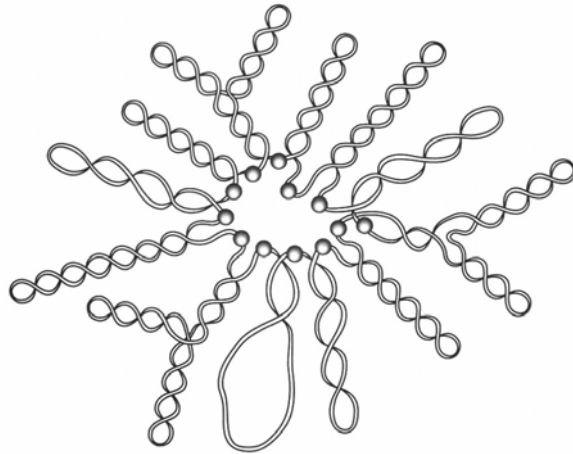


Figure 5 : Représentation schématique du chromosome d'*E. coli*. Sinden 1998

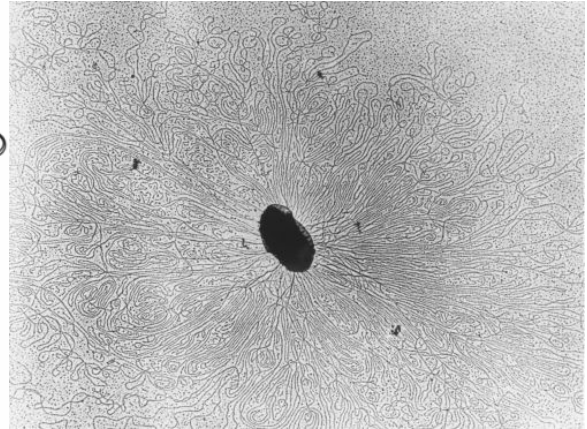


Figure 6 : Photographie de l'organisation du chromosome d'*E. coli* en domaines topologiques. Snyder et Champness (1997)

Depuis, de nombreux travaux ont été réalisés afin de comprendre l'organisation de ces domaines, d'estimer leur nombre par chromosome et de mesurer leur taille. Plusieurs résultats ont démontré que, contrairement à ce qui avait été mis en avant au sujet de la stabilité structurale du chromosome bactérien, son organisation est une structure fluide (Postow et *al.*, 2004, Higgins et *al.*, 2005).

Les domaines topologiques ne sont pas placés aux mêmes sites chez plusieurs cellules issues du même clone. De plus, ces domaines ont une taille moyenne de 10 Kb mais celle-ci varie en fonction du cycle cellulaire. Ces domaines seraient séparés grâce à des interactions temporaires entre des sites du chromosome et des facteurs cellulaires stables comme la membrane interne. Les complexes protéiques qui se déplacent le long de la matrice d'ADN comme le complexe transcriptionnel (Postow et *al.*, 2004, Deng et *al.*, 2005), certaines protéines de type histone (Hardy et Cozzarelli., 2005), les complexes de la réplication (Viollier et *al.* 2004) et l'association de topoisomérases à l'ADN (Staczek et Higgins., 1998) seraient responsables de la formation de ces domaines. Ces barrières permettent le maintien du surenroulement global du chromosome en protégeant chacun des domaines d'un changement du surenroulement causé, par exemple, par la

transcription, mais également en séquestrant à un endroit donné une portion d'ADN relaxée à la suite, par exemple, d'une cassure double brin (Hardy et Cozzarelli., 2005) (figure 7). En d'autres termes, ces protéines forment des barrières pour bloquer la diffusion du surenroulement entre les différentes régions du chromosome et jouent également un rôle important dans la compaction de l'ADN. Chaque domaine topologique aurait son propre niveau de surenroulement.

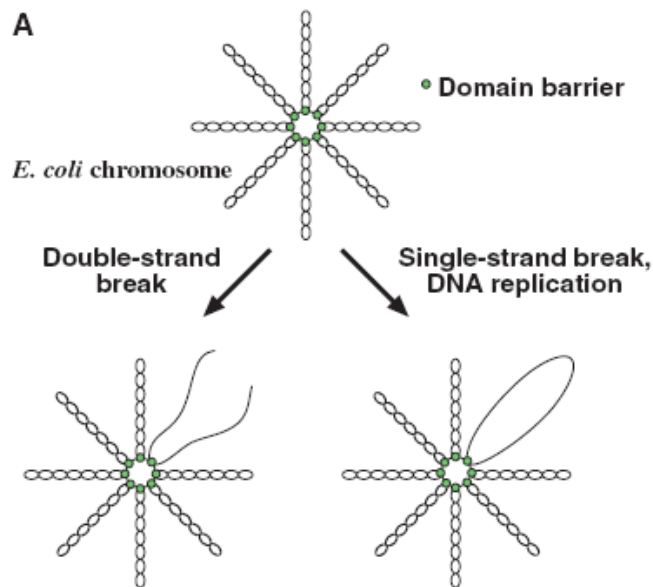


Figure 7 : représentation schématique du chromosome d'*E. coli* organisé en domaines topologiques. Une cassure double ou simple brin dans un domaine conduit à sa relaxation complète sans affecter les autres domaines (Hardy et Cozzarelli., 2005)

Finalement, le surenroulement global est défini comme la moyenne de surenroulement de tous les domaines topologiques.

I.1.3 Le surenroulement local

Le surenroulement local résulte de processus biologiques comme la réplication et la transcription au sein d'un domaine topologique. En effet, le déplacement d'un complexe protéique le long du brin d'ADN comme le complexe transcriptionnel génère des modifications dans la topologie de l'ADN. Le « Twin domain model » décrit par Liu et Wang en 1987 en est un parfait exemple (figure 8). Durant l'initiation de la transcription, l'ARN polymérase est capable de tourner autour de la matrice d'ADN mais l'allongement de l'ARN durant l'étape d'élongation et la présence de ribosomes sur

l'ARN force l'ADN à tourner sur lui-même. Il se crée alors un excès de surenroulement négatif en arrière de l'ARN polymérase et du surenroulement positif en avant, générant de ce fait 2 autres domaines topologiques au sein du domaine principal. L'action simultanée de la topoisomérase I et de la gyrase, deux topoisomérases antagonistes, permet de rétablir le niveau de surenroulement en relaxant les supertours négatifs (topoisomérase I) et en relaxant les supertours positifs (gyrase). Plusieurs transcriptions simultanées dans le même sens vont générer des domaines topologiques transitoires qui s'annuleront tandis que des transcriptions dans des sens opposés vont générer des différences importantes dans le niveau du surenroulement.

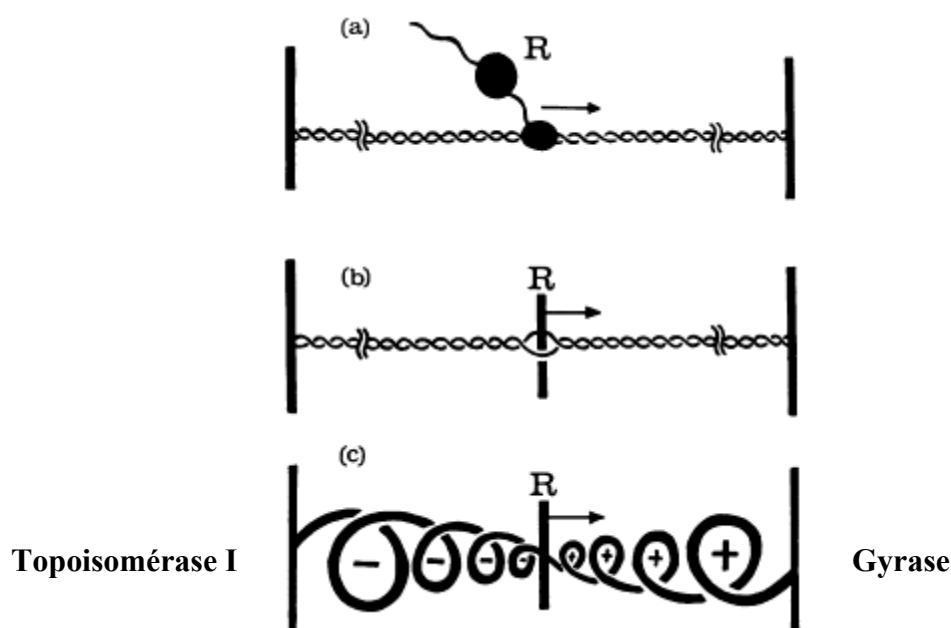


Figure 8 : représentation schématique du « Twin Domain Model » proposé par Liu et Wang (Liu et Wang., 1987).

De récentes recherches suggèrent également que des interactions spécifiques supplémentaires entre la matrice d'ADN et des protéines comme les répresseurs Lac et Gal ou bien avec l'initiateur de la réplication λO stimule l'excès de surenroulement généré durant la transcription en facilitant le mécanisme du « Twin Domain Model » (Leng et McMacken., 2002). De plus, chez les procaryotes, le couplage

transcription/traduction d'un gène dont le produit s'ancore à la membrane (comme le gène *tetA*) va bloquer la rotation du complexe transcriptionnel et générer également une augmentation du surenroulement. Depuis, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* supportent le mécanisme du « Twin Domain Model » (Wu et *al.*, 1988, Tsao et *al.*, 1989, Rahmouni et Wells., 1992, Lynch et Wang., 1993, Krasilnikov et *al.*, 1999, Leng et McMacken., 2002, Drolet et *al.*, 2003, Dröge et Nordheim., 1991, Leng et *al.*, 2004).

I.2. Les topoisomérases

Un maintien précis du surenroulement est essentiel pour la viabilité cellulaire. Les topoisomérases participent au maintien du niveau de surenroulement (Zechiedrich et *al.*, 2000, Wang., 1996, Berger., 1998) et leur expression dépend également de celui-ci (Menzel et Gellert., 1983; Osheroff et *al.*, 1983; Tse-Dinh., 1985). Le surenroulement affecte la division cellulaire (Martínez-Robles et *al.*, 2009), l'attachement de protéines à l'ADN, la compaction du chromosome et favorise les interactions entre des séquences éloignées l'une de l'autre (Vologodskii et Cozzarelli., 1996). De plus, de nombreux mécanismes affectent et sont eux-mêmes affectés par le niveau de surenroulement de l'ADN. La recombinaison homologe requiert et est influencée par le niveau de surenroulement négatif (Mizuuchi et *al.*, 1978; Nash., 1990). La recombinaison en elle-même peut mener à la formation de nœuds entre les brins d'ADN et également à la formation de caténanes (Mizuuchi et *al.*, 1980, Wasserman et Cozzarelli., 1986). L'initiation de la réplication requiert de l'ADN surenroulé négativement (Marians et *al.*, 1986, Funnel et *al.*, 1987).

Les topoisomérases sont des enzymes essentielles retrouvées chez tous les êtres vivants. Elles sont capables de relaxer soit les supertours négatifs, soit les supertours des deux signes. C'est en coupant transitoirement les brins d'ADN et en catalysant le passage des brins d'ADN à travers la coupure qu'elles modifient le nombre d'enlacements. Elles sont donc capables d'augmenter ou de diminuer le nombre de supertours dans une molécule d'ADN. En plus de leur rôle au niveau des supertours certaines sont capables de réaliser les réactions de caténation et décaténation des ADN circulaires ou de séparer des chromosomes linéaires entremêlés (figure 9). Elles jouent donc un rôle capital dans les mécanismes cellulaires tel que la réplication, la transcription, la recombinaison, qui

causent des modifications topologiques importantes. Les topoisomérases peuvent relaxer l'excès de surenroulement positif pour que la réplication puisse s'effectuer complètement (Wang., 1996). De plus, sans une condensation précise du chromosome, la ségrégation échouerait (Zechiedrich et Cozzarelli., 1995, Zechiedrich et *al.*, 1997, Hartsuiker et *al.*, 1998). Pour la plupart des gènes, l'initiation de la transcription requiert également du surenroulement négatif (Pruss et Drlica., 1989, Chen et *al.*, 1994). Le déplacement du complexe transcriptionnel le long de la matrice génère également du surenroulement positif en avant et négatif en arrière (Gamper et Hearst., 1982, Liu et Wang., 1987, Wu et *al.*, 1988, Wang., 1998). L'expression de certains gènes dépendent du niveau de surenroulement de l'ADN (Shneider et *al.*, 1990, Hatfield et Benham., 2002).

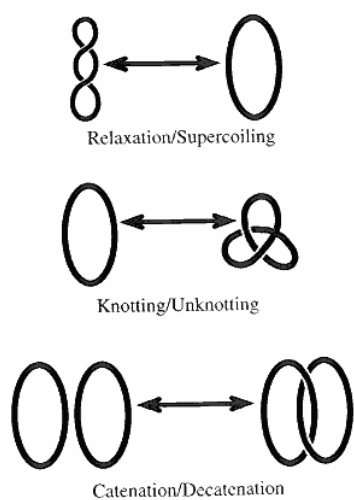


Figure 9 : Réactions catalysées par les topoisomérases.

<http://www.bentham.org/cmcaca/sample/cmcaca1-1/holden/holden-ms.htm>

On distingue les topoisomérases de type I avec les sous groupes IA (topoisomérase I), IB (aucune topoisomérase d'*E. coli* n'appartient à ce groupe mais parmi les procaryotes étudiés, la topoisomérase V de la bactérie hyperthermophile *M. kandleri* appartient à ce groupe). Elles clivent 1 brin d'ADN à la fois et changent le Lk de 1. Enfin, il y a les topoisomérases de type II avec les sous groupes IIA (gyrase et topoisomérase IV) et IIB (aucune topoisomérase procaryote n'appartient à ce groupe mais on y retrouve la topoisomérase VI de l'archéobactérie *S. shibatae*). Elles sont capables de cliver 2 brins d'ADN à la fois et changent le Lk de 2 (figure 10).

Toutes les topoisomérases ont en commun l'utilisation d'une tyrosine pour cliver le brin d'ADN et former une liaison covalente (liaison phosphotyrosil) entre la tyrosine et

l'extrémité 3' du brin clivé pour les topoisomérases de type IB ou avec l'extrémité 5' pour les topoisomérases des types IA, IIA et IIB.

A ce jour, 2 mécanismes expliquent les changements dans la topologie de l'ADN suite à l'action d'une topoisomérase. Un ADN simple brin peut être clivé et les supertours sont enlevés via la rotation du duplexe d'ADN autour de la cassure (type IB) (Redinbo et *al.*, 1998; Keck et Berger., 1999). Dans le deuxième mécanisme, 1 ou 2 brins du duplexe est clivé tandis que le second brin passe à travers la cassure avant que celle-ci soit résolue (type IA, IIA et IIB) (Tse et *al.*, 1980; Brown et Cozzarelli., 1981; Bergerat et *al.*, 1994, Keck et Berger., 1998).

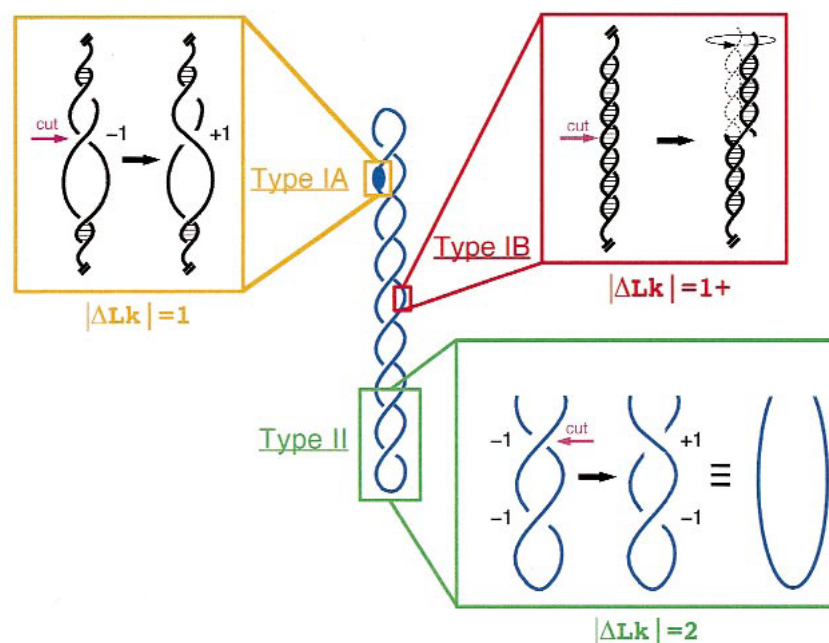


Figure 10 : (a) clivage simple brin et rotation du duplexe d'ADN autour de la cassure (b) clivage simple brin et passage du 2^{ème} brin à travers la cassure (c) Clivage des 2 brins d'ADN et passage du duplexe d'ADN à travers la cassure. L'ADN simple brin est représenté en noir tandis que les duplexes d'ADN sont représentés en bleus. Keck et Berger., 1999.

Dans les paragraphes qui suivent, nous discuterons plus spécifiquement des topoisomérases bactériennes.

I.2.1 Les topoisomérases de type IA

Les topoisomérases de type IA ont plusieurs propriétés; en plus d'être monomériques, elle reconnaissent spécifiquement les portions d'ADN simple brin (Kirkegaard et *al.*, 1985) et requiert la présence de Mg^{2+} comme cofacteur pour leur activité de relaxation (figure 11). Cette dernière n'est jamais totale et le Lk ne change que d'une unité par réaction. Seul l'ADN surenroulé négativement est utilisé comme substrat pour la relaxation. En plus de leur capacité à relaxer, elles sont capable d'emmêler et de démmêler des molécules circulaires simples et doubles brins, de réaliser des réactions de caténation et décaténation de duplexes d'ADN circulaires coupés ou contenant des trous.

La topoisomérase I (codée par *topA*) et la topoisomérase III (codée par *topB*) d'*Escherichia coli* appartiennent à ce groupe. Cependant, il a été démontré clairement que les topoisomérases de type IA n'ont pas toutes exactement les mêmes propriétés. Par exemple, la topoisomérase III d'*E. coli* est plus efficace pour décaténer ce qui supporte le rôle de celle-ci durant la réplication (DiGate et Mariani, 1988, Hiasa et *al.*, 1994), mais reste peu efficace pour relaxer l'ADN contrairement à la topoisomérase I.

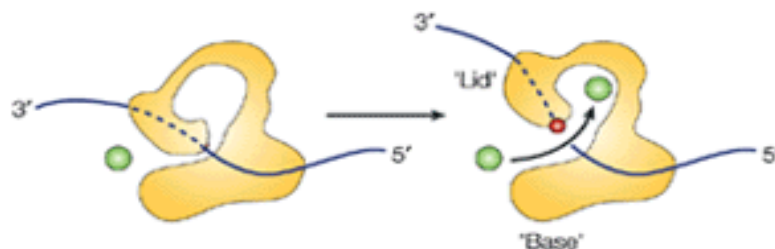


Figure 11 : représentation schématique du mécanisme d'action des topoisomérases de type IA. L'extrémité 5' du brin d'ADN clivé est étroitement fixée au site actif de la tyrosine localisée dans « le nid de l'enzyme » tandis que l'extrémité 3' du brin est libre. Un des domaines se déplace afin d'écarter les 2 brins séparés accompagnant ainsi le passage de l'autre brin à travers la cassure. Ce même domaine revient à sa position initiale pour permettre la religation des 2 brins avant de se déplacer à nouveau pour relarguer le brin d'ADN et recommencer un nouveau cycle. Wang., 2002.

a) La topoisomérase I

La topoisomérase I (*topA*) relaxe l'excès de surenroulement négatif lorsque des régions simples brins sont exposées, comme par exemple durant la transcription. Lors d'une étude menée sur la topoisomérase I et la transposase Tn5 chez *E. coli*, (Yigit et Reznikoff., 1999), il s'est avéré qu'il existait une relation étroite entre l'ARN polymérase

et la topoisomérase I puisque ces dernières étaient toujours co-purifiées. Des expériences ont confirmé plus tard que cette interaction était plus importante lorsque les cellules étaient soumises à un stress et qu'elle se faisait entre le domaine C-terminal en doigt de zinc de la topoisomérase I et la sous-unité β' de l'ARN polymérase (Cheng *et al.*, 2003a). Lorsque des mutants *topA* étaient utilisés, l'ARN polymérase n'était jamais co-purifiée. La transcription *in vitro* d'un plasmide en présence de topoisomérase I mais en absence de gyrase génère un plasmide surenroulé positivement, mais l'ajout *in vitro* du motif en doigt de zinc inhibe la formation de supertours positifs.

Des mutants délétés du gène *topA* ont une croissance presque normale, malgré une augmentation prévisible du surenroulement négatif. Des études génétiques ont mis en évidence la présence de mutations compensatoires dans les gènes *gyrA* (souche DM750) et *gyrB* (DM800) codant pour la gyrase (DiNardo *et al.*, 1982; Pruss *et al.*, 1982) qui permettraient aux cellules de survivre. À cause de ces mutations dans la gyrase, le niveau de surenroulement négatif dans ces souches était plus bas que celui présent dans des souches normales. Des essais de gyrase montrent en effet une activité réduite de cette dernière (DiNardo *et al.*, 1982; Raji *et al.*, 1985) conduisant ainsi à une diminution du niveau de surenroulement (McEachern et Fisher., 1989 ; Oram et Fisher., 1992). Ces mutations sont des réponses à une augmentation excessive du niveau de surenroulement dans la cellule en absence de topoisomérase I. Une des conséquences de l'excès de surenroulement est la formation des R-loop qui inhibe la croissance cellulaire (Drolet *et al.*, 1995; Massé et Drolet., 1999b et c) (voir plus loin). Ces expériences ont permis de mettre en évidence une balance entre la topoisomérase I et la gyrase dans le maintien du surenroulement cellulaire.

b) La topoisomérase III

Des études menées sur la topoisomérase III (codé par *topB*) ont démontré que cette dernière n'était pas indispensable à la viabilité cellulaire. A sa découverte, les chercheurs lui ont attribué la même propriété que la topoisomérase I pour relaxer l'ADN (Dean *et al.*, 1983; Srivenugopal *et al.*, 1984). Plus tard, des études biochimiques ont démontré qu'elle était capable de relaxer les supertours négatifs à une température de 52°C. Cette spécificité est justifiée par le fait qu'à cette température, plusieurs régions

d'ADN se retrouvent simple brin. La topoisomérase III peut séparer les intermédiaires de réplication *in vitro* (Digate et Marians., 1988; Du et *al.*, 1995) et démêler des structures appelées précaténanes générées durant la réplication (Hiasa et Marians., 1994; Peter et *al.*, 1998; Nurse et *al.*, 2003). La topoisomérase III s'est avérée beaucoup plus efficace pour décaténer que pour relaxer. En effet, une incubation à 30°C suffit largement à effectuer les réactions de décaténation. Il a été également prouvé que la topoisomérase III agit en équipe avec l'hélicase RecQ pour réaliser des réactions de caténation entre 2 molécules d'ADN circulaires intactes *in vitro* (Harmon et *al.*, 1999; Harmon et *al.*, 2003).

Une surexpression de la topoisomérase III est capable de défaire les R-loops (voir plus loin) chez des mutants *topA*⁻ (Broccoli et *al.*, 2000). Elle participe également dans le mécanisme de ségrégation des chromosomes en équipe avec la topoisomérase I durant la recombinaison homologue (Zhu et *al.*, 2001). Chez des cellules *topB*⁻ on observe un fort taux de recombinaison homologue et donc de mutations (Schofield et *al.*, 1992; Uematsu et *al.*, 1997), mais aucune mutation compensatoire n'a été identifiée contrairement aux mutants *topA* (Digate et Marians., 1989). De plus, un double mutant *topA topB* est non viable (Zhu et *al.*, 2001). Cette viabilité est restaurée si le gène *recA* est muté. Ces dernières observations suggèrent d'une part qu'un mutant *topA* ne pourrait survivre sans une topoisomérase III active, et que cette dernière intervient après RecA durant la recombinaison homologue.

I. 2. 2 Les topoisomérases de type II

Les topoisomérases capables de cliver 2 brins à la fois sont appelées topoisomérases de type II (figure 12). La sous division des topoisomérases au sein de ce groupe est basée principalement sur la structure et a été faite suite à la découverte de la topoisomérase VI de chez *Sulfolobus shibatae* (Bergerat et *al.*, 1997 et Buhler et *al.*, 1998). Elles utilisent le Mg²⁺ comme cofacteur et hydrolyse l'ATP pour leurs réactions (Roca., 1995; Sugino et *al.*, 1978; Maxwell et *al.*, 2005). Elles catalysent le passage d'un ADN double brin intact (segment T) à travers un autre ADN double brin clivé (segment G) (Wang., 1998; Wang., 2002). Le clivage induit une liaison covalente entre chaque sous-unité de l'enzyme et l'extrémité 5'. Elles sont capables de relaxer les supertours positifs et négatifs de 2 supertours à la fois (Berger et *al.*, 1996). Seule la gyrase

procaryote est capable d'introduire des supertours négatifs. Lorsque les segments G et T appartiennent à la même molécule, le passage d'un brin à travers la cassure mène à un changement du Lk soit en ajoutant des supertours soit en enlevant. Les topoisomérases de type II sont capables de changer le Lk de 2 pour une molécule d'ADN circulaire (Brown et *al.*, 1979; Mizuuchi et *al.*, 1980 et Liu et *al.*, 1980). On distingue les topoisomérases de type IIA comme la gyrase et la topoisomérase IV d'*Escherichia coli* et le type IIB (topoisomérase VI de l'archéobactérie *S. shibatae*).

Ces 2 types d'enzymes partagent des caractéristiques fonctionnelles communes mais diffèrent au niveau structural notamment dans leur partie C terminale (Nichols et *al.*, 1999). L'efficacité de réaction de ces enzymes dépend des caractéristiques structurales du substrat et du complexe ADN-topoisomérase.

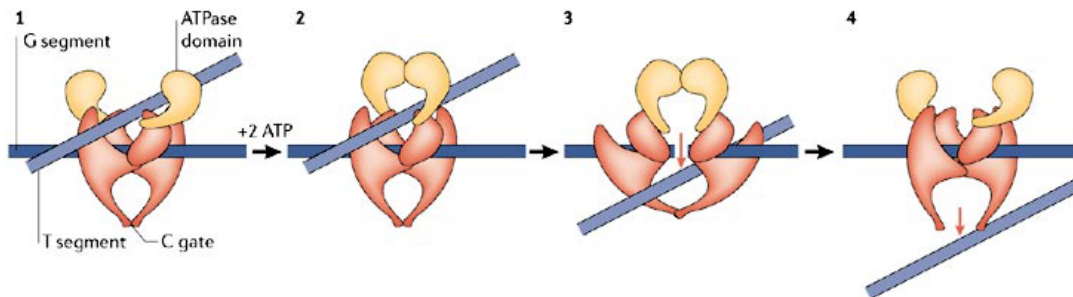


Figure 12 : Représentation schématisée du mécanisme d'action des topoisomérases de type II. Les topoisomérases de type II se fixent à la fois sur le segment G aussi appelé « porte » et sur le segment T appelé « brin transporté ». L'hydrolyse de 2 ATP provoque la fermeture du domaine N-terminal ATP-ase. Le clivage du segment G précède le passage du segment T à travers la cassure avant que celle-ci soit résolue. Cozzarelli et *al.*, 2006

a) La gyrase

La gyrase est un hétérotétramère constituée de 2 sous-unités A (codées par *gyrA*) et 2 sous-unités B (codées par *gyrB*). Lors de la fixation de la gyrase, le brin d'ADN entoure l'enzyme sur une région d'environ 130 bp (Orphanides et Maxwell., 1994; Liu et Wang., 1978). Les sous-unités B ont une activité ATPasique tandis que les sous-unités A sont responsables de la coupure transitoire de l'ADN. Comme il a été dit auparavant, la gyrase est capable d'introduire des supertours négatifs en présence d'ATP (Wang., 1996; Wang., 2002) contrairement à la topoisomérases IV (voir plus loin), bien qu'elle soit capable de relaxer également l'ADN surenroulé négatif en absence d'ATP. Le surenroulement négatif est un facteur clé dans les processus cellulaires et il a été démontré

que l'inactivation de la gyrase par un inhibiteur ou une mutation cause une relaxation du chromosome (Drlica et Snyder., 1978; Lockshon et Morris., 1983) et perturbe entre autre la réplication et la transcription (Mirkin et *al.*, 1982, Smith et *al.*, 1978; Kubo et *al.*, 1979). Il est établi que de nombreux promoteurs sont sensibles au niveau de surenroulement négatif *in vivo*. Contrairement aux topoisomérase I et III, la gyrase est une enzyme essentielle. Il est donc impossible d'obtenir des souches bactériennes dans lesquelles soit *gyrA* ou *gyrB* serait complètement inactivé.

La gyrase est la principale topoisomérase capable de relaxer l'excès de surenroulement positif généré en avant des complexes de la transcription et de la réplication durant leur déplacement (Liu et Wang., 1997; Khodursky et *al.*, 2000). L'inhibition de la gyrase par mutation mène à un ralentissement de la réplication voir même à un arrêt lorsque la tension est trop forte (Peebles et *al.*, 1979). Les quinolones sont des molécules organiques artificielles qui interagissent spécifiquement avec la gyrase et la topoisomérase IV (Drlica et *al.*, 2009, Nakamura et *al.*, 1989; Kumagai et *al.*, 1996; Heisig et *al.*, 1996), en formant un complexe quinolone-topoisomérase-ADN (Hooper., 1999). Leur fixation sur la sous-unité GyrA (gyrase) ou ParC (topoisomérase IV) provoque un changement conformationnel de l'enzyme. Chacun des brins d'ADN est clivé et la quinolone prévient leur religation (Hooper., 1999). Par leurs actions, les quinolones empêchent la réplication de l'ADN en inhibant l'action de la gyrase en avant de la fourche de réplication. Les effets sur la réplication via l'action des quinolones sur la topoisomérase IV sont plus faibles, puisque cette dernière agit en arrière de la fourche de réplication (Khodursky et Cozzarelli., 1998). L'inhibition de la gyrase aura également des conséquences sur la transcription, la réparation de l'ADN et la recombinaison. A de faibles concentrations, l'effet des quinolones est réversible et est donc bactériostatique. A forte concentration, les quinolones sont bactéricides et leur action est donc irréversible (Zhao et *al.*, 1997).

b) La topoisomérase IV

Comme la gyrase, la topoisomérase IV est un hétérotétramère formé de 2 sous-unités, ParC et ParE (Peng et Marians., 1993). C'est la sous-unité ParC qui se lie à l'ADN tandis que ParE fixe et hydrolyse l'ATP. Les rôles principaux de la topoisomérase IV

sont de dénouer (décaténation) les chromosomes à la fin de la réplication (Adams et *al.*, 1992; Zechiedrich et Cozzarelli., 1995; Hiasa et Mariani., 1996) et durant la recombinaison homologue (Zechiedrich et *al.*, 1997), et de relaxer l'ADN cellulaire surenroulé positivement et négativement (Zechiedrich et *al.*, 2000).

Avant la découverte de la topoisomérase IV (Kato et *al.*, 1990), la décaténation des chromosomes à la fin de la réplication était attribuée à la gyrase. Des études subséquentes menées sur des mutants thermosensibles pour la topoisomérase IV ont montré que la gyrase était capable de réaliser les réactions de décaténation, mais que son efficacité était largement inférieure à celle de la topoisomérase IV, ce qui ne suffisait pas à corriger les problèmes de ségrégation des chromosomes (Zechiedrich et Cozzarelli., 1995). Il a été observé que l'activité de la topoisomérase IV est facilitée par l'action de la gyrase via l'introduction de supertours négatifs (Zechiedrich et Cozzarelli., 1995; Zechiedrich et *al.*, 1997). La topoisomérase IV jouerait également un rôle déterminant dans les processus d'élongation de la réplication (Adams et *al.*, 1992). De plus la, topoisomérase IV, avec la topoisomérase I, joue un rôle important dans le maintien du niveau de surenroulement du chromosome, en éliminant les supertours négatifs générés en excès par la gyrase (Zechiedrich et *al.*, 2000). La surexpression de la topoisomérase IV conduit d'une part, à réduire l'expression de certains gènes sensibles au niveau de surenroulement (Free et Dorman., 1994) et d'autre part peut compenser pour la perte de topoisomérase I (Kato et *al.*, 1990). Comme la gyrase, la topoisomérase IV est essentielle à la viabilité cellulaire.

I.3. Les R-loops

Un R-loop est une structure à 3 brins où le brin d'ADN matrice est associé à une portion de l'ARN nouvellement transcrit, tandis que l'autre brin d'ADN est déplacé et non-apparié.

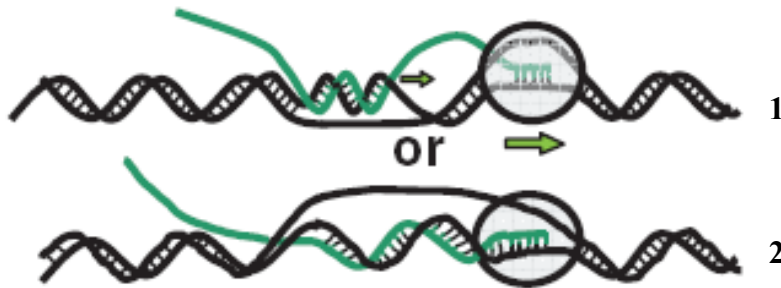


Figure 13 : représentation schématique des 2 types de R-loop possibles : (1) le R-loop est formé en amont du complexe transcriptionnel et (2) la formation du R-loop est directement initié dans la bulle de transcription (Drolet., 2006)

La RNase HI codée par le gène *rnhA* est une endoribonucléase capable de dégrader l'ARN dans les R-loops.

I.3. 1 Facteur influençant la formation des R-loop

a) Le surenroulement : transcription et excès de surenroulement négatif chez le mutant *topA*

La transcription *in vitro* du plasmide pBR322 en présence d'ARN polymérase et de gyrase mais sans topoisomérase I génère des plasmides hypersurenroulés négativement, suggérant la formation de R-loop. En effet, l'ajout de RNase HI durant la transcription empêchait la formation de plasmides hypersurenroulés. Ces observations suggèrent que l'accumulation locale de supertours négatifs en amont du complexe transcriptionnel est responsable de la formation des R-loop (Drolet *et al.*, 1994). De plus, l'allongement du R-loop tend à relaxer le plasmide ce qui pousse la gyrase à introduire encore plus de supertours négatifs et à allonger le R-loop. L'extraction d'ADN élimine l'ARN impliqué dans le R-loop et révèle l'hypersurenroulement négatif. Le terme hypersurenroulement négatif a été utilisé pour la première fois en 1985 (Pruss., 1985)

pour décrire des topoisomères plasmidiques ayant une densité de surenroulement tellement élevée (plus de deux fois celles de plasmides extraits de cellules normales), qu'ils ne pouvaient être séparés par électrophorèse en gel d'agarose en présence de l'intercalateur d'ADN tel la chloroquine.

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'hypersurenroulement, d'autres études ont été réalisées *in vivo* avec le plasmide pBR322, qui possède entre autre le gène *tetA* codant pour la résistance à la tétracycline. Il s'est avéré que la formation des plasmides pBR322 hypersurenroulés négativement dépendait de la transcription de ce gène (Pruss., 1985; Pruss et Drlica., 1986). Le produit de ce gène s'ancrage à la membrane lors de la co-transcription/traduction contraignant ainsi les supertours en bloquant la rotation du complexe transcriptionnel autour du brin d'ADN, générant de ce fait la formation d'hypersurenroulement négatif chez les mutants *topA* (Lodge et *al.*, 1989; Lynch et Wang., 1993). Le plasmide a alors été modifié en délétant la région 5' correspondant à la séquence Shine-Dalgarno, au domaine trans-membranaire et au codon ATG initiateur pour empêcher la synthèse du produit du gène *tetA* et donc éviter l'ancrage du complexe transcriptionnel à la membrane cellulaire (Massé et Drolet., 1999). Le plasmide ainsi modifié était transformé dans une souche *topA gyrB(Ts)*. A 28°C, lorsque la gyrase est totalement active, les plasmides extraits étaient hypersurenroulés. La surexpression de RNase HI abolissait totalement l'hypersurenroulement négatif. De plus, l'ajout de spectinomycine (inhibiteur de la synthèse protéique) durant la croissance n'empêchait pas la formation d'hypersurenroulement négatif. Ces résultats signifiaient donc que la formation d'hypersurenroulement était directement liée à la formation de R-loops et non à l'ancrage à la membrane, quoique ce dernier puisse contribuer à la formation d'hypersurenroulement lorsque la gyrase n'est pas pleinement active.

D'autres essais *in vitro* ont été réalisés sur le fragment HindIII de l'opéron *rrnB*. Ce fragment a été transcrit à la fois dans le sens physiologique et dans le sens inverse avec des ARN polymérases phagiques, T3 et T7. Les ARN ribosomiaux sont connus pour être fortement transcrits et non traduits. Aucun ribosome ne pourra donc s'y fixer et la formation d'hypersurenroulement ne pourra donc être associée à la co-transcription/traduction, mais seulement au mécanisme de transcription. Les résultats ont tout d'abord montré que la formation d'hypersurenroulement négatif et la formation de

R-loops avaient lieu préférentiellement lorsque le fragment était transcrit dans le sens physiologique (Phoenix et *al.*, 1997). L'ajout de RNase A durant la transcription dans le sens physiologique n'empêchait pas la formation de R-loop, suggérant que l'ARN synthétisé n'était jamais déplacé et que la formation du R-loop était directement initiée dans la bulle de transcription. En effet, la RNase A est une endonucléase qui clive l'ARN simple brin non-apparié. Ces résultats montrent que le sens de la transcription joue un rôle prépondérant dans la formation des R-loops. Ceci se justifie par le fait que l'ARN obtenu dans le sens physiologique contient plus de bases puriques (adénine et guanine). En effet, des études ont démontré que la stabilité des hybrides ARN-ADN est proportionnelle à la quantité de bases puriques dans l'ARN transcrit (Roberts et Crothers., 1992). Il est important de signaler que des essais de transcription *in vitro* avaient été réalisés avec l'ARN polymérase d'*E. coli*. Il s'est avéré que, contrairement à la transcription avec l'ARN polymérase phagique, la formation de R-loops était abolie par l'ajout de RNase A durant la transcription (Massé et Drolet., 1999). Ce résultat démontrait alors que les R-loops formés avec l'ARN polymérase d'*E. coli* étaient initiés en arrière de la bulle de transcription, par le ré-appariement de l'ARN naissant avec le brin ADN matrice.

Des études *in vivo* ont été réalisées sur des mutants *topA gyrB(Ts): Δ(topA cysB) gyrB203(Ts)* et *topA::Tn10 gyrB203(Ts)*. Le premier mutant a une délétion qui enlève totalement les gènes *topA* et *cysB* tandis que le deuxième mutant contient une insertion du transposon *Tn10* dans le gène *topA*. De plus, chacun de ces mutants contient l'allèle *gyrB* thermosensible permettant d'obtenir une gyrase pleinement active à des températures de 28°C et inférieures, et donc d'avoir de véritables mutants *topA* lorsque les cellules sont exposées à ces basses températures (Drolet et *al.*, 1995). Ces expériences ont montré qu'à la température restrictive où la gyrase est active (28°C), la croissance est ralentie mais que celle-ci est rétablie par la surexpression de la RNase HI. Ceci s'explique par le fait qu'à 37°C, l'inactivité de la gyrase compense l'absence de topoisomérase I mais qu'à 28°C, la gyrase redevient active et favorise l'élongation et la stabilisation de R-loops. De plus, il a été clairement établi que la quantité de RNase HI nécessaire était proportionnelle à l'activité de la gyrase (Drolet et *al.*, 1995). D'autres études ont montré

que des doubles mutants *topA rnhA* étaient non-viables, peu importe la présence ou non de mutations compensatoires (Drolet et *al.*, 1995).

Finalement, ces résultats nous montrent qu'une mutation à la fois dans la topoisomérase I et dans le gène *rnhA* est désastreuse pour la cellule puisqu'elle favorise la formation de R-loops et d'hypersurenroulement négatif. La gyrase et l'excès de supertours négatifs seraient donc des régulateurs positifs de la formation de R-loops alors que la topoisomérase I et la RNase HI seraient des régulateurs négatifs.

D'autres expériences *in vivo* ont été réalisées en fusionnant le fragment HindIII, dans l'orientation physiologique ou dans le sens inverse, à un promoteur inductible à l'IPTG (Massé et *al.*, 1997). L'extraction topologique des plasmides d'un mutant *topA* montrait que la formation d'hypersurenroulement était détectée lorsque le fragment était transcrit dans son orientation physiologique. Il s'est également avéré que l'action de la RNase HI *in vivo* était moins efficace qu'*in vitro* probablement dû à la présence d'autres protéines qui stabiliseraient l'hypersurenroulement négatif (Massé et *al.*, 1997).

D'autres expériences réalisées avec des mutants *topA* ne portant pas de gyrase thermosensible, ont également démontrées la production d'ADN hypersurenroulé négativement dépendant des R-loops, lorsque les cellules étaient exposées à de basses températures (Drolet et Massé., 1999). La quantité d'ADN hypersurenroulé corrélait également avec l'activité de la gyrase. Donc, la température et l'état de la gyrase sont des facteurs importants pour l'accumulation de R-loops et d'ADN hypersurenroulé. En somme, chez les mutants $\Delta topA$, l'excès de surenroulement négatif stimule l'initiation et l'élongation des R-loop. La présence de R-loop va relaxer temporairement l'ADN et donc stimuler la gyrase qui introduit à nouveau des supertours négatifs. La destruction de l'ARN impliqué dans le R-loop par la RNase HI génère l'hypersurenroulement. On parle alors de « cycle d'auto-stimulation » (Drolet., 2006).

b) La richesse en bases G

i. Chez les eucaryotes

Il existe sur les chromosomes eucaryotes des domaines constitués de régions répétées riches en bases G/C : les séquences télomériques (Shampay et *al.*, 1984; Parkinson et *al.*, 2002; Neidle et Parkinson., 2003), les régions S codant pour la

permutation des classes des immunoglobulines chez les lymphocytes B (Shimizu et Honjo., 1984), l'ADN mitochondrial (Xu et Clayton., 1995), les minisatellites chez l'humain (Bois et Jeffreys., 1999).

Lorsque les lymphocytes B immatures sont mis en contact avec un épitope exogène, ils expriment en premier lieu à leur surface, des IgM et des IgD. Puis, ces lymphocytes B subissent plusieurs étapes de maturation afin de synthétiser d'autres classes d'immunoglobulines (IgE, IgA et IgG). Ces étapes de maturation s'effectuent par recombinaisons homologues. Ce mécanisme est appelé commutation de classe.

Concrètement, le gène codant pour les immunoglobulines est organisé de façon à ce que l'exon μ (IgM) se retrouve du côté 5' suivi des exons γ (IgG), ϵ (IgE) et α (IgA). Des régions spécifiques appelées régions S sont situées en amont de chacun des exons. La formation d'une boucle de délétion entre 2 régions S permet l'excision de l'exon μ (ou de plusieurs exons) aboutissant à la commutation des classes des immunoglobulines. Ces régions « S » sont riches en bases G/C (Yu et *al.*, 2003). La transcription de chacune de ces régions génère des structures particulières transitoires sur l'ADN.

Plusieurs modèles seraient proposés : les G quartets ou G-loop (Sen et Gilbert., 1988; Dempsey et *al.*, 1999; Duquette et *al.*, 2004), les stem-loops (Tashiro et *al.*, 2001), les R-loop (Yu et *al.*, 2003) et la bulle stabilisée par RPA (protéine de réplication A) (Chaudhuri et *al.*, 2004) (figure 14).

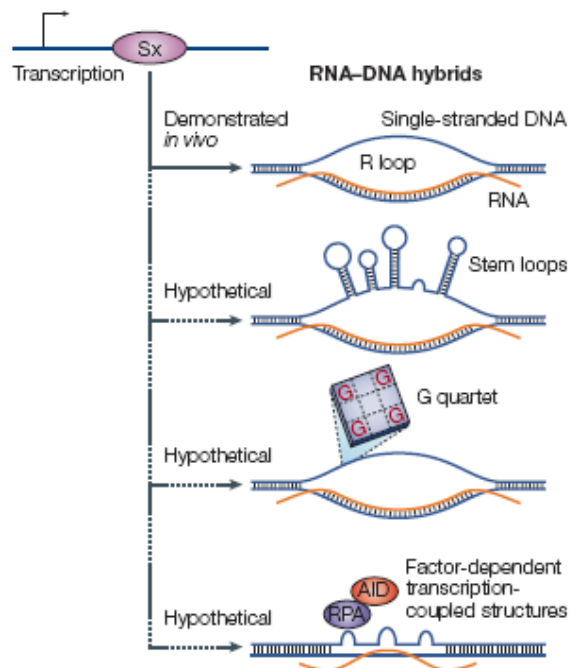


Figure 14 : Proposition de structures générées durant la commutation de classe des Immunoglobulines (Chaudhuri et Alt., 2004).

A ce jour, seul le modèle des R-loop a été démontré comme acteur évident dans le changement de classe des immunoglobulines à la fois *in vitro* lorsque la transcription se fait dans le sens physiologique (Reaban et Griffin., 1990; Reaban et *al.*, 1994; Huang et *al.*, 2006) et *in vivo* (Yu et *al.*, 2003). Finalement, des études réalisées à l'aide d'un microscope à force atomique ont permis l'observation claire d'hybride ADN-ARN lorsque des régions S riches en bases G/C étaient transcrites *in vitro* (Mizuta et *al.*, 2005). L'utilisation d'un analogue à la guanine (l'ITP) n'a pas permis l'observation d'une telle structure suggérant l'importance primordiale de l'appariement entre les bases G et C via des liaisons hydrogènes de type Hoogsteen et Watson-Crick.

Il a été également prouvé qu'un R-loop formé durant des expériences de transcription *in vitro* de régions S pouvait mesurer plus de 1 Kb (Yu et *al.*, 2003).

Chez les eucaryotes, de nombreuses autres régions riches en G/C sont capables de former des R-loops durant la transcription.

Chez les mammifères, le proto-oncogène *c-myc* codant pour un facteur affectant divers processus cellulaires impliqués dans la prolifération des cellules, l'apoptose, la croissance des cellules ainsi que leur métabolisme contient également des régions riches en bases G/C sur le brin non-codant similaires aux régions « S » des immunoglobulines. La transcription de ce gène générerait *in vitro* des G quartets responsable de l'ouverture et de la stabilisation des brins d'ADN et de la formation de R-loop (Duquette et *al.*, 2005).

Des régions spécifiques de l'ADN mitochondrial (ADNmt) chez les vertébrés (humain, souris...) et *S. cerevisiae* sont également capables de former des R-loops. Les origines de réplication de l'ADNmt *ori*, *ori1*, *ori2*, *ori3*, *ori5* chez *S. cerevisiae*, contiennent un promoteur suivi d'une séquence appelée « GC cluster C » riche en bases G/C et homologue à la séquence conservée CSBII sur le chromosome mitochondrial. La transcription *in vitro* du « GC cluster C » provoque la formation de R-loops stables (Xu et Clayton., 1995).

Chez *S. cerevisiae*, Huertas et Aguilera ont mis en évidence le rôle important du complexe nucléaire THO/TREX dans la prévention de la formation de R-loop durant la transcription. La synthèse d'ARNm s'effectue en trois étapes majeures (initiation, élongation et terminaison). Durant l'élongation de la transcription, plusieurs facteurs

interagissent avec l'ARN polymérase II dont le complexe THO/TREX. THO a été identifié pour la première fois chez la levure *S. cerevisiae* (Chávez et al., 2000). Il est constitué de 4 sous-unités Tho2, Mft1, Thp2 et Hpr1. Les sous-unités de THO sont étroitement associées à deux autres facteurs codés par les gènes Sub2B-Yra1 et Tex1 pour former le complexe TREX. Il a été démontré que la mutation d'une seule de ces sous-unités augmente significativement le taux de recombinaison et réduit significativement la transcription pour des régions répétées, particulièrement pour les régions riches en bases G/C comme dans le gène *lacZ* (Chávez et Aguilera., 1997; Piruat et Aguilera., 1998; Chávez et al., 2001). Il a été montré que Hpr1 joue un rôle primordial dans la transcription de séquences riches en bases G/C. Des expériences ont été réalisées où plusieurs segments du gène *lacZ* ont été fusionnés au promoteur GAL1 chez des mutants $\Delta hpr1$. Il s'est avéré que la transcription était affectée selon la distance entre les segments et le promoteur. En somme, plus le fragment était long et plus la transcription était affectée ainsi que le taux de recombinaison. Finalement la taille du fragment transcrit ainsi que la richesse en bases G/C seraient 2 facteurs influençant grandement la transcription *in vivo*. Plus tard, une équipe démontra que la taille du fragment transcrit n'était pas véritablement un facteur influençant la transcription mais plutôt la longueur de l'ARNm synthétisé (Huertas et Aguilera., 2003). Le complexe THO/TREX n'était finalement pas directement requis pour la transcription par l'ARN polymérase II des séquences riches en bases G/C mais c'était plutôt la formation de R-loops qui bloquait l'élongation. L'expression de RNase HI complémente le défaut d'élongation de la transcription chez les mutants $\Delta hpr1$. La formation de ces R-loops serait due à une augmentation locale des supertours négatifs en arrière de l'ARN polymérase II, favorisant ainsi la dénaturation des brins d'ADN et donc l'apparition de régions d'ADN simple brin. L'ARNm naissant aurait alors de fortes chances de former un R-loop et donc de bloquer la progression de l'ARN polymérase II. Il a été observé que les hybrides ADN-ARN seraient formés au niveau de l'extrémité 3' de l'ARNm chez les mutants $\Delta hpr1$. De plus, d'autres résultats supportent la présence de R-loops chez ces mutants : des cellules combinant des mutations pour le complexe THO et les topoisomérases sont profondément malades (Aguilera et Klein., 1990; Sadoff et al., 1995). Un déséquilibre dans la concentration intracellulaire d'histones est létal pour les mutants $\Delta hpr1$ (Fan et

Klein., 1994; Zhu et *al.*, 1995) et les nucléosomes ne peuvent se positionner sur des séquences d'ADN riches en bases G/C (Chávez et *al.*, 2001). Toutes ces évidences supporteraient le fait que la richesse en bases G/C de l'ADN transcrit, l'excès local de supertours négatifs durant la transcription de même que la longueur de l'ARN nouvellement synthétisé, influenceraient la formation des R-loops.

ii. Chez les procaryotes

Chez *E. coli*, la transcription de l'opéron *rrn* riche en bases G/C peut provoquer la formation de R-loops *in vitro* et *in vivo* (Massé et *al.*, 1997; Phoenix et *al.*, 1997; Hraiky et *al.*, 2000). Plus précisément, la transcription dans le sens physiologique du fragment HindIII de l'opéron *rrn* favorisait la formation de R-loops stables. Il s'est avéré que ce fragment était plus riche en bases G dans son orientation physiologique. Si la transcription avait lieu dans le sens inverse, des R-loops étaient formés uniquement lorsque la gyrase était présente (Phoenix et *al.*, 1997).

En somme, il semble que la richesse en bases G/C soit un paramètre important dans la formation des R-loop puisqu'il s'en forme préférentiellement lorsque l'ARN est G-riche. On parlera de R-loop spécifiques (spécificité de séquence). Cependant, il ne contribue pas seul à leur formation puisque la topologie de l'ADN semble également déterminante. Nous avons vu auparavant qu'une certaine densité de surenroulement était requise pour former les R-loops et ce, indépendamment de la séquence. On parlera alors de R-loop non spécifiques.

iii. Autre structure : le G-loop

Des expériences de transcription *in vivo* et *in vitro* de régions G-riche comme les régions « S » avaient montré la présence d'une structure stable et particulière de l'ADN visible au microscope électronique qui se formerait co-transcriptionnellement contenant des G-quartet sur le brin d'ADN transcrit tandis que le brin d'ADN non transcrit serait hybridé avec l'ARN néosynthétisé (figure 15).

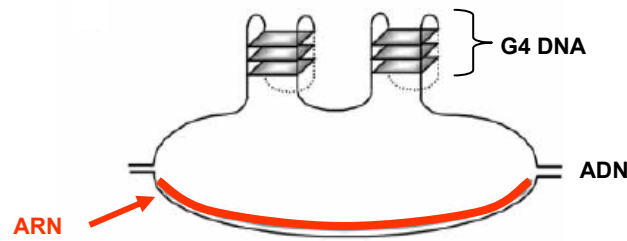


Figure 15 : formation d'un G-loop durant la transcription d'une région riche en Guanine. Duquette et *al.*, 2004

En 1988, Sen et Gilbert avaient déjà observé qu'un simple brin d'ADN contenant des régions riches en guanines était capable de se replier sur elle-même et d'adopter une structure particulière en forme de tétrade (Sen et Gilbert., 1988). Ils suggèrent qu'il existe des liaisons hydrogène de type Hoogsteen entre les bases C et G. L'appariement triplex de Hoogsteen fait intervenir le N₇ de la guanine qui participe à la liaison hydrogène (figure 16).

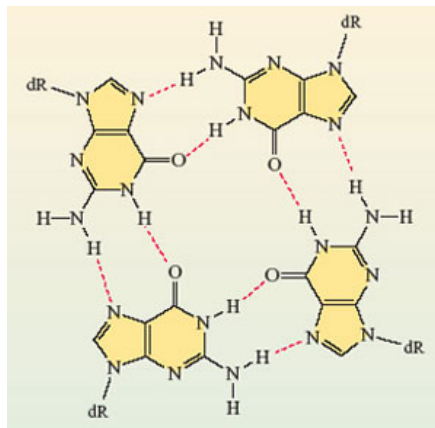


Figure 16 : Modèle de formation des tétrades de guanine par des liaisons hydrogènes de type Hoogsteen. <http://openlearn.open.ac.uk>

Les expériences de transcription *in vitro* sur des séquences riches en G ont montré qu'uniquement dans l'orientation physiologique le G-loop s'étendait sur 50% de la région transcrite, et que 25% à 60% de cette région contenait de l'ADN G4 (Duquette et *al.*, 2004). L'analyse par microscopie électronique a également prouvé l'absence de G quartet sur les séquences non transcrites prouvant le rôle primordial de la transcription.

Afin de mieux comprendre l'impact de la topologie de l'ADN sur la formation de ces G-loop, des réactions de transcription ont été réalisées sur des ADN super-enroulé, relaxé et linéaire. Quelque soit la topologie de la matrice, des G-loop sont formés.

La substitution des dCTP par de l'ITP sur le brin codant ne forme jamais de G-loop prouvait de ce fait qu'il existe une importante spécificité stable entre les bases C et les bases G.

Pour les G-loop, à la différence des R-loop où l'augmentation du surenroulement négatif favorise l'ouverture des brins, c'est la présence des G quartet qui stabilise l'ouverture des brins d'ADN.

c) Stimulation des R-loop par un stress chez le mutant *ΔtopA*

Pour s'adapter aux stress environnementaux, les bactéries emploient plusieurs facteurs permettant de synthétiser rapidement les protéines nécessaires à leur survie.

Chez *E. coli*, on retrouve entre autre, le facteur σ_{32} encodé par le gène *rpoH*, permettant à l'ARN polymérase de reconnaître les promoteurs des gènes d'adaptation au stress à la chaleur et le facteur σ_S , encodé par le gène *rpoS*, qui participe au contrôle de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse à différents stress comme le manque de nutriments dans le milieu, le stress osmotique, le choc acide, le choc au froid, le choc à la chaleur, le stress oxydatif et l'adaptation en phase stationnaire (Loewen., 1994; Rui et Tse-Dinh., 2003). Le gène *topA* codant pour la topoisomérase I, possède 4 promoteurs dont P1 et Px1 reconnus respectivement par le facteur σ_{32} et σ_S .

La topoisomérase I est connue pour relaxer les supertours négatifs en arrière du complexe transcriptionnel (Liu et Wang., 1987). De nombreuses expériences ont montré qu'en absence de topoisomérase I, on observait souvent la présence de R-loop dû à l'accumulation d'hypersurenroulement négatif (Drolet et *al.*, 1994) et que finalement la topoisomérase I pouvait prévenir leur formation comme mentionné précédemment.

Des études préliminaires menées chez les mutants *ΔtopA* ont démontré leur grande difficulté à croître lorsque les cellules étaient soumises à différents stress tel les chocs thermiques, contrairement à une croissance plutôt normale dans un milieu et des conditions adéquats (Stupina et Wang., 2005). L'exposition des cellules à ces stress déclenchait une forte transcription des facteurs σ_{32} et σ_S et la surexpression de RNaseHI chez les mutants *ΔtopA* leur permettait de retrouver en partie une croissance normale (Cheng et *al.*, 2003b). Ces résultats permettaient de suggérer qu'une souche sauvage

soumise à un stress aurait besoin de synthétiser rapidement de la topoisomérase I pour s'adapter et inhiber la formation de R-loop (Weinstein-Fischer et *al.*, 2000).

Quelques hypothèses sont avancées au sujet de la formation de R-loop dépendants du stress. Il est possible que le niveau intracellulaire d'ATP des cellules exposées au stress augmente rapidement et stimule la gyrase qui introduit des supertours négatifs (Drlica., 1992). D'autres raisons peuvent expliquer aussi ce phénomène : la présence de protéines inhibitrices de la synthèse protéique ou le blocage des sites de fixation des ARNm aux ribosomes empêcheraient transitoirement le couplage de la transcription et de la traduction puisque l'ARNm naissant serait nu et donc susceptible de s'apparier avec le brin d'ADN pour former un R-loop (voir plus bas) (Massé et Drolet., 1999b, c; Broccoli et *al.*, 2004).

d) Le découplage transcription/traduction chez les procaryotes, le découplage transcription/épissage chez les eucaryotes

i. Chez les procaryotes

Chez les bactéries, la synthèse et la traduction des ARNm se fait simultanément et à la même vitesse. L'ARNm néosynthétisé est alors déplacé pour être traduit par les ribosomes en protéines. On parle alors du couplage transcription/traduction (figure 17).

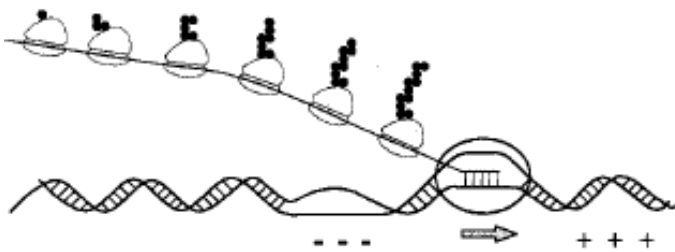


Figure 17 : représentation schématique du couplage transcription/traduction chez les procaryotes (Massé et Drolet., 1999c).

Selon le mécanisme du « Twin domain model », la topoisomérase I serait donc indispensable au bon déroulement de la transcription (Wu et *al.*, 1988, Drolet et *al.*, 1994). Il a été également prouvé via des expériences de transcription *in vitro* que les R-loop pouvaient être ciblés par la topoisomérase I pour son activité de relaxation (Phoenix

et *al.*, 1997). Il a été établi clairement que l'action combinée de la topoisomérase I et de la RNase HI durant la transcription permettait l'inhibition de la formation de R-loop (Phoenix et *al.*, 1997, Massé et *al.*, 1997).

Chez les mutants *ΔtopA*, des mutations compensatoires survenues naturellement dans les gènes codant pour les sous-unités GyrA et GyrB de la gyrase ont été identifiées. Ces mutations ont pour conséquence d'empêcher la gyrase d'augmenter le surenroulement négatif permettant de ce fait, aux mutants *ΔtopA* de croître (DiNardo et *al.*, 1982). Cependant, il a été observé que la croissance de mutants *ΔtopA* était plus lente que pour des cellules WT et que la surproduction de RNase HI (enzyme capable de dégradé l'ARN impliqué dans un R-loop) permettait de corriger partiellement ce phénotype. Les R-loop semblaient donc en partie responsables des problèmes de croissance chez ces mutants (Drolet et *al.*, 1995).

Des expériences ont été menées chez un mutant *ΔtopA* où la gyrase était active. Ces souches possédaient également le plasmide pBR322 Δ tet5' et étaient capables de surproduire ou non la RNase HI. Cette délétion permet en somme de transcrire seulement le gène *tetA* sans que son ARNm soit traduit. La délétion du site d'attachement au ribosome sur *tetA* ou bien l'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse protéique rendait l'hypersurenroulement sensible à la RNase HI (Massé et Drolet., 1999b; Broccoli., 2004). Ces expériences ont permis de conclure que la topoisomérase I avait un rôle majeur dans l'élongation de la transcription puisqu'elle empêchait la formation de R-loops en prévenant l'accumulation de supertours négatifs en arrière du complexe transcriptionnel (Massé et Drolet., 1999a, b).

Des expériences *in vivo* ont été réalisées également à basse température sur des mutants *ΔtopA gyrB(Ts)* qui possédaient le plasmide pBR322 Δ tet5'. Il s'est avéré, que la formation de R-loop dû à l'hypersurenroulement durant la transcription coïncidait directement avec l'inhibition de croissance des mutants *topA*⁻ mais également avec le niveau d'activité de la gyrase (Massé et Drolet., 1999b).

L'ajout d'un inhibiteur de la traduction (spectinomycine) durant la croissance des mutants *ΔtopA gyrB(Ts)* possédant cette fois-ci un plasmide avec le gène *tetA* intact a également prouvé que les R-loop formés sur le plasmide étaient directement liés à la transcription du gène *tetA* (Massé et Drolet., 1999b).

Il a été supposé que durant une croissance à basse température de mutants *AtopA*, il pouvait s'effectuer en plus du ralentissement de la vitesse de transcription, un découplage de la transcription-traduction induisant alors la formation et l'élongation de R-loops. Dans ce modèle, l'ARNm dépourvu de ribosomes serait capable de se ré-hybrider avec le brin d'ADN modèle derrière le complexe transcriptionnel.

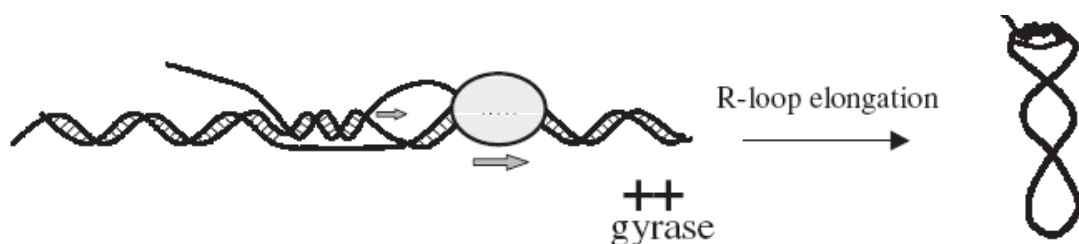


Figure 18 : représentation schématique de la formation d'un R-loop lors d'un découplage transcription-traduction chez les procaryotes (Broccoli et *al.*, 2004).

Tous ces résultats signifient que le couplage étroit de la transcription et de la traduction permettrait d'inhiber la formation de R-loops.

ii. Chez les eucaryotes

Le découplage de la transcription-épissage/maturation chez les eucaryotes pourraient être également responsable de la formation de R-loops (Aguilera., 2005). *In vivo*, chez les eucaryotes, avec le pré-ARNm subit plusieurs étapes de maturation avant d'être traduit en protéine. Ces étapes incluent la fixation de la coiffe, l'épissage et la polyadénylation. Finalement le produit obtenu est appelé mRNP pour ARNm-ribonucléoprotéine. Toutes ces étapes sont étroitement couplées. Le domaine C-terminale de l'ARN-polymérase II joue un rôle primordial dans ce couplage puisqu'il agit comme une plateforme permettant la fixation des facteurs d'épissage (figure 19).

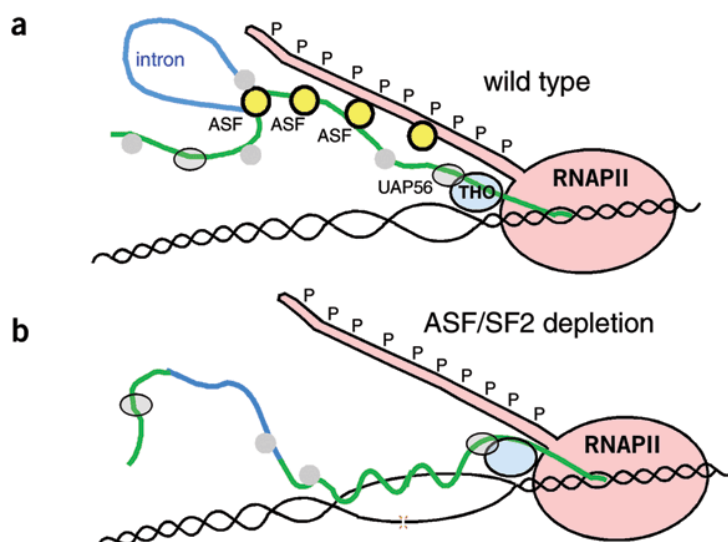


Figure 19 : représentation schématique de la formation co-transcriptionnelle de R-loops chez des cellules déficientes en ASF/ASF2. Aguilera., 2005.

Chez les eucaryotes, le facteur protéique ASF/SF2 est connu pour agir en début de l'étape d'épissage (Ge et Manley., 1990; Krainer et *al.*, 1990a, b) mais également dans la prévention de l'instabilité génomique dépendant de la transcription (Li et Manley., 2005a, b). En effet, ils ont prouvé entre autre qu'une déplétion d'ASF/SF2 provoquait la formation de R-loops ainsi qu'une instabilité génomique et que la surexpression de RNase HI abolissait ces phénotypes. Selon Li et Manley, ces résultats montraient finalement qu'ASF/SF2 se fixait sur le pré-ARNm naissant durant la transcription via le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II non seulement pour promouvoir l'épissage mais également pour prévenir la formation de R-loops en empêchant l'hybridation de l'ARNm avec le brin d'ADN matrice.

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'absence du complexe THO/TREX qui intervient à l'interface entre la transcription et la maturation des ARN pré-messagers génère de l'hyper-recombinaison. La correction de ces phénotypes via la surexpression de la RNase HI ainsi que la mise en évidence de R-loops démontraient que ceux-ci étaient formés de manière co-transcriptionnelle, qu'ils inhibaient l'élongation de la transcription et qu'ils étaient la cible de recombinaisons (Huertas et Aguilera., 2003). De plus, il avait été observé auparavant que les doubles mutants *Δhpr1Δtop1* avaient une croissance très

lente comparativement à un simple mutant *Δhpr1* indiquant de ce fait que la topoisomérase I était indéniablement requise chez un mutant *Δhpr1* (Aguilera et Klein., 1990). Ces résultats indiquaient qu'ils agissaient de manière complémentaire. C'est ainsi que l'ARNm non protégé permettra la formation des R-loops.

e) Interaction protéine-ADN chez les eucaryotes

Chez les eucaryotes, la transcription de l'ADN en ARNm se fait via l'ARN polymérase II. Plusieurs modifications doivent s'effectuer au préalable pour que l'ARNm puisse être traduit correctement. La première modification du pré-ARNm est l'ajout à l'extrémité 5' de l'ARN d'une « structure-coiffe » caractérisée par un résidu 7-méthyl-guanosine relié au premier nucléotide de l'ARNm. Cette étape est co-transcriptionnelle puisqu'elle s'effectue dès l'initiation de la transcription lorsque l'ARNm contient de 25 à 30 nucléotides (Jove et Manley., 1984; Rasmussen et Lis., 1993). Cette coiffe stabilise considérablement l'ARNm et promeut une initiation efficace de la traduction. Elle sert de marqueur pour l'ARN polymérase II et interagit physiquement avec cette dernière au niveau du domaine C-terminal de la grosse sous-unité CTD. Sa synthèse s'effectue en 3 réactions enzymatiques successives. Tout d'abord, le phosphate de l'extrémité 5'-triphosphate de l'ARN nouvellement synthétisé est libéré par la RTPase (ARN triphosphatase). La GTase (guanylyl transférase) va ensuite transférer le GTP en GMP de l'extrémité 5'-diphosphate. Finalement, une ARN méthyl transférase (MTase) y ajoute un groupement méthyl en position N7 (Mizumoto et Kaziro., 1987).

Plusieurs études ont indiqué que ce mécanisme co-transcriptionnel est une étape indispensable dans l'initiation de la transcription. Afin de mieux comprendre le rôle du CTD durant la phase initiale de la transcription, des chercheurs ont réalisé des transcriptions *in vitro* en fusionnant le CTD d'une souris avec une T7 ARN polymérase (CTD-T7 ARNP). Les résultats ont montré que la coiffe stimulait la formation de R-loop. Le domaine GTase de la coiffe serait fortement impliqué. De plus, la phosphorylation du CTD serait également requise dans la formation d'un R-loop. L'ajout du facteur d'épissage ASF/SF2, connu pour prévenir la formation de R-loops inhibait l'action de la coiffe à ce niveau.

I.3.2 Propriétés des R-loop chez les eucaryotes et les procaryotes

Étonnamment, la formation des R-loop peut avoir également des effets bénéfiques pour la croissance des cellules eucaryotes et procaryotes en servant par exemple d'amorce à la réplication mais, également dans la différenciation des lymphocytes B pour les cellules humaines.

a) Amorce pour la réplication

Les ARN sont connus pour être traduits en protéines mais également pour servir d'amorce dans la réplication. C'est le cas pour le plasmide ColE1 et le mode de réplication alternatif cSDR (constitutive Stable DNA Replication) chez *Escherichia coli*. La réplication de l'ADN mitochondrial chez les eucaryotes implique également des R-loops.

i. Chez les procaryotes : réplication des plasmides ColE1

ColE1 est un plasmide de 6,6 Kb qui est présent à un haut taux de copies par cellules (environ 20 copies) (Chan et *al.*, 1985). La réplication de ce plasmide est initiée à partir d'une région de 0,6 Kb appelée *ori* et progresse de manière unidirectionnelle (Tomizawa et *al.*, 1974, Tomizawa et *al.*, 1975, Tomizawa et *al.*, 1977, Ohmori et *al.*, 1987). Ce mécanisme de réplication requiert uniquement les protéines synthétisées par la cellule hôte (Donoghue et Sharp., 1978, Tomizawa et *al.*, 1977). Pour initier la réplication à partir de la séquence *ori*, plusieurs enzymes sont requises comme l'ARN polymérase, la RNase HI, l'ADN polymérase I, tout comme la gyrase et la topoisomérase I (Hillenbrand et Staudenbauer., 1982, Itoh et Tomizawa., 1979, Itoh et Tomizawa., 1980, Minden et Marians., 1985). La gyrase va promouvoir la progression de la fourche de réplication en permettant l'ouverture des brins d'ADN (Orr et Staudenbauer., 1981, Minden et Marians., 1985). La topoisomérase I, par son activité de relaxation, empêche l'ARN polymérase de synthétiser des R-loops comme amorces à d'autres endroits qu'*ori* (voir plus loin).

Le mécanisme de réplication du plasmide ColE1 a été largement étudié au cours de ces dernières années et le modèle proposé par Tomizawa a été clairement supporté par de nombreuses expériences biochimiques et génétiques.

Chez une cellule de type sauvage, l'initiation de la réplication commence à 555 pb en amont du site *ori* où l'ARN polymérase transcrit une amorce d'environ 700 pb appelé ARN II (Itoh et Tomizawa., 1980, Tomizawa et *al.*, 1981, Tomizawa et Masukata., 1987), dont l'extrémité 3' jusqu'à sa moitié est hybridé au brin d'ADN matrice (Itoh et Tomizawa., 1980, Selzer et Tomizawa., 1982). Ce processus appelé aussi « couplage » est dépendant de la structure secondaire adoptée par l'extrémité 5' de l'ARN II (Firshein et *al.*, 1982, Masukata et Tomizawa., 1984, Wong et Polisky., 1985, Masukata et Tomizawa., 1986). En effet, il a été démontré que si l'extrémité 5' arborait une conformation différente, la synthèse de l'amorce avortait (Masukata et Tomizawa., 1984, Masukata et Tomizawa., 1986). L'ARN II précurseur de l'amorce d'ARN mature encore hybridée à l'ADN est clivé à plusieurs sites par la RNase HI. L'amorce mature devient alors la cible de l'ADN polymérase I qui va procéder à l'élongation de la réplication à partir de l'extrémité 3' en éliminant sur son chemin les fragments d'ARN II restants grâce à son activité exonucléasique 5'-3'. Finalement, la RNase HI va reconnaître et cliver l'ARN II une dernière fois au niveau d'une séquence répétée de 5 ATPs située au niveau de la séquence *ori* (figure 20).

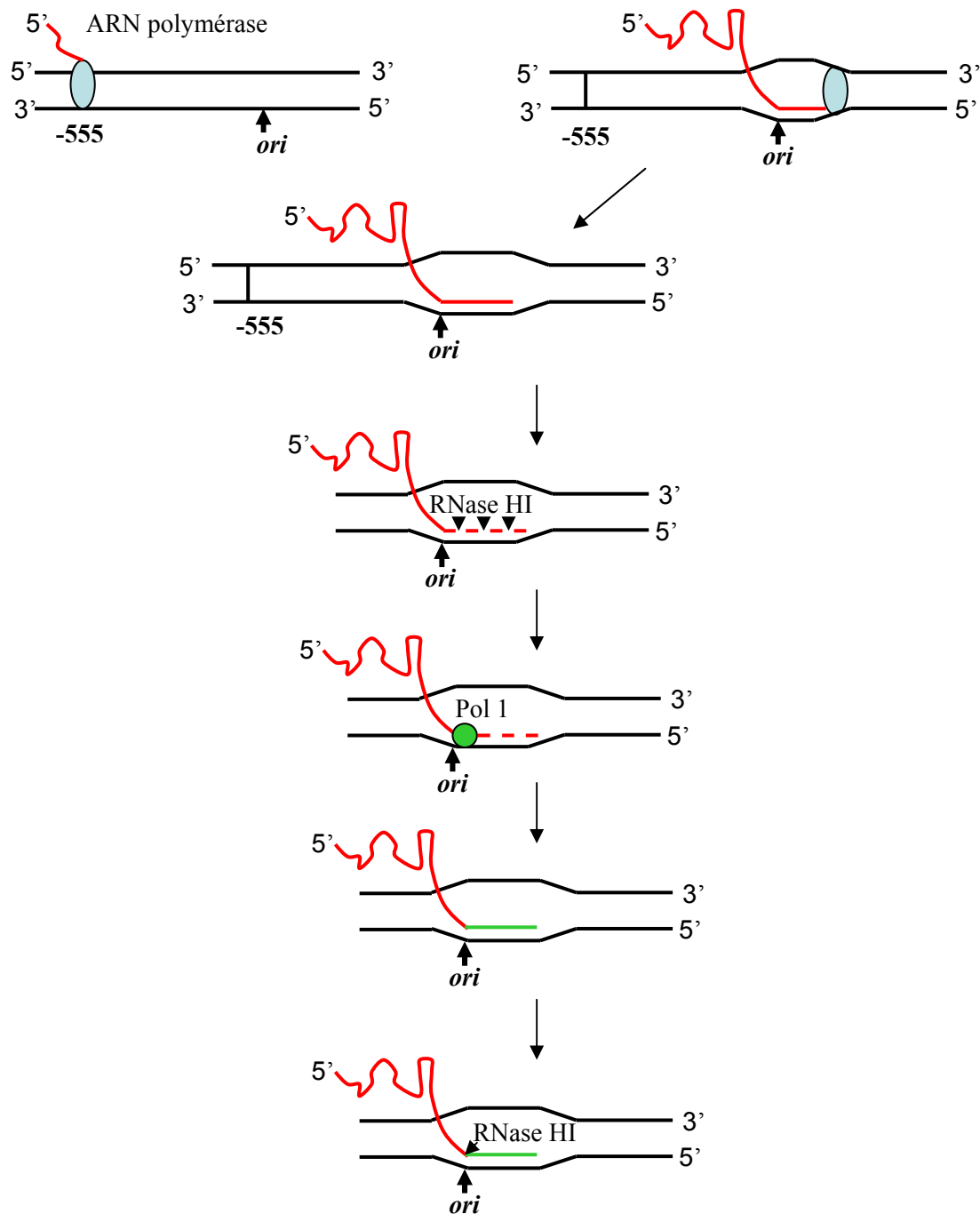


Figure 20 : Mécanisme cSDR chez les mutants *rnhA*⁻

Normalement la réplication du chromosome bactérien est initiée à partir d'*oriC* et plusieurs enzymes comme la topoisomérase I et la RNase HI participent au maintien de ce mécanisme.

En effet, ces 2 enzymes sont connues pour être des inhibiteurs de la formation des R-loop (Ogawa et *al.*, 1984; Ogawa et Okazaki., 1984, Drolet., 2006). En 1983, Kogoma et ses collègues ont démontré que des mutants *rnhA*⁻ supportaient les délétions *oriC* et *dnaA* et permettaient d'initier la réplication à un site autre qu'*oriC*. Ce mécanisme est appelé cSDR pour « constitutive Stable DNA Replication » (Kogoma et Von Meyenburg., 1983; Kogoma et *al.*, 1985a, b). Durant le mécanisme de cSDR, la réplication du chromosome est semi-conservatif (Kogoma., 1978) et ce dernier est totalement répliqué.

Des études préliminaires avaient révélées que certains mutants étaient capables de répliquer entièrement leur chromosome même si la région *oriC* étaient délétées mais également qu'ils étaient sensibles à la rifampicine mais pas au chloramphénicol (Kogoma., 1978, Von Meyenburg et *al.*, 1987). Il a été identifié par la suite que ces cellules portaient des mutations dans le gène *rnhA* codant pour la RNase HI qui dégrade l'ARN impliqué dans les R-loops (Ogawa et *al.*, 1984, Ogawa et Okasaki., 1984). Ces résultats signifiaient que l'absence de RNase HI permettaient de stabiliser les R-loops qui étaient utilisés pour initier à la réplication (De Massy et *al.*, 1984, Ogawa et *al.*, 1984).

Plus tard des études ont permis de mettre en évidence chez des doubles mutants *rhna ΔoriC* que l'initiation de la réplication via le cSDR pouvait débiter au niveau de 5 sites dont 2 présents dans la région *terC*. Ces origines de réplifications ont été appelées *oriK* (De Massy et *al.*, 1984). Ces cellules avaient une croissance plus lente avec deux fois moins d'ADN répliqué (Von Meyenburg et *al.*, 1987).

Il a été également prouvé que chez les simples mutants *rnhA*⁻, l'initiation de la réplication via *oriC* et *oriK* pouvait avoir lieu mais que la voie par *oriC* était préférentiellement utilisée par la cellule (De Massy et *al.*, 1984).

ii. Réplication mitochondriale chez les eucaryotes

Le génome mitochondrial est double brin (brin L et H), circulaire et sa réplication est totalement indépendante du cycle cellulaire et de la réplication de l'ADN nucléaire (Bogenhagen et Clayton., 1977, Bogenhagen et Clayton., 1978, Clayton., 1992). Plusieurs études ont confirmé que la réplication de l'ADN mitochondrial (ADNmt) se

faisait suivant un modèle dans lequel elle débutait à partir de séquences *ori*, que son élongation est bidirectionnelle et qu'elle nécessite la synthèse d'ARN comme amorce.

Chez les eucaryotes, l'ARN polymérase mitochondriale associée à des facteurs de transcription commence la transcription à partir du promoteur du brin L pour générer un ARN précurseur de l'amorce, qui reste hybridé à l'ADN au niveau de l'origine de réplication du brin L, formant alors un R-loop stable. Une RNase coupe alors près ou à l'intérieur du brin d'ARN impliqué dans le R-loop aboutissant finalement à l'amorce pour la réplication. La synthèse du nouveau brin L crée une boucle D qui s'étend et qui déplace le brin parental. Dès que le brin déplacé dépasse l'origine de réplication du brin H, la synthèse d'un nouveau brin H commence (Lee et Clayton., 1996; Xu et Clayton., 1996; Shadel et Clayton., 1997; Fernández-Silva et *al.*, 2003)).

b) Instabilité génomique

i. Chez la levure

L'instabilité génomique peut être à l'origine de nombreux désordres génétiques et peut être générée via plusieurs mécanismes tels que la réplication, la réparation d'une cassure dans l'ADN mais également durant la transcription. Dans le cas de la transcription, un phénomène appelé TAR (Transcription Associated Recombination) a été décrit chez la levure.

L'étude chez *S. cerevisiae* du complexe protéique THO/TREX impliqué dans le métabolisme de l'ARNm et de son exportation, a montré que l'absence de ce complexe aboutissait à l'altération de l'élongation de la transcription (Chavez et Aguilera., 1997, Prado et *al.*, 1997, Piruat et Aguilera., 1998) et à plusieurs phénotypes comme l'hyper-recombinaison (Strasser et *al.*, 2002, Jimeno et *al.*, 2002, Rondón et *al.*, 2003).

Le complexe THO/TREX participe avec d'autres facteurs comme Sub2/UAP56 et Yra1/ALY, à l'exportation de l'ARNm (Strasser et *al.*, 2002). Étrangement, l'absence de ces facteurs dans la cellule conduisait également à un haut taux de recombinaisons (Fan et *al.*, 2001, Jimeno et *al.*, 2002). Plusieurs expériences ont apporté l'évidence que le complexe THO/TREX jouait un rôle dans la prévention des R-loop formés durant l'élongation de la transcription ce qui éviterait les recombinaisons homologues et permettrait une transcription efficace. Les R-loops étaient formés co-

transcriptionnellement en arrière de l'ARN polymérase II et génèrent de l'hyper-recombinaison. Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer le processus au cours duquel l'ARNm néosynthétisé pouvait provoquer une instabilité génomique et l'hyper-recombinaison : la réplication et les nucléases ou agents génotoxiques.

Il a déjà été prouvé auparavant chez *E.coli* que le réassemblage d'une fourche de réplication après son blocage nécessite des mécanismes de recombinaison (McGlynn et Lloyd., 2002, Seigneur et *al.*, 1998). Aussi, il se peut que chez la levure, le R-loop formé durant la transcription ou bien le complexe mRNP-ARNpolyméraseII- ADN provoque un arrêt de la fourche de réplication pouvant désassembler totalement cette dernière et engendre des cassures dans l'ADN. De plus, des expériences de transcriptions *in vitro* de régions riches en répétitions de bases G/C causaient un arrêt de la fourche de réplication (Krasilnikova et *al.*, 1998).

Des nucléases ou des agents génotoxiques pourraient hydrolyser également le brin d'ADN non impliqué dans le R-loop ce qui provoquerait des cassures dans l'ADN. En effet, cette théorie peut être appuyée par exemple, par le fait qu'un double mutant *Arnh1 Arnh2* est largement sensible aux agents comme l'hydroxyurée, la caféine et l'éthyl méthanosulfonate (Arudchandran et *al.*, 2000).

ii. Chez les eucaryotes supérieurs

Chez les eucaryotes supérieurs, l'épissage des ARN pré-messagers implique de nombreux facteurs caractérisés par un domaine de liaison à l'ARN comme les protéines SR. Les protéines SR regroupent en fait plusieurs phosphoprotéines nucléaires jouant un rôle central en tant que facteurs constitutifs et en tant que régulateurs dans la sélection des sites d'épissage 5' et 3'. Plusieurs études ont démontré leur rôle primordial dans la viabilité et le développement des cellules mammifères. La plus étudiée parmi les protéines SR est le facteur ASF/ASF2.

Le facteur ASF/ASF2 agit à plusieurs niveaux dans le mécanisme de l'épissage. Il participe à l'assemblage du spliceosome, dans la régulation de l'épissage constitutif tout comme dans celle de l'épissage alternatif grâce à des interactions avec l'ARNm et/ou avec d'autres facteurs (Manley et Tacke., 1996, Graveley., 2000, Sanford., 2003). Il agit

aussi dans l'exportation de l'ARNm (Huang et Steitz., 2005), dans la stabilité de l'ARNm (Lemaire et *al.*, 2002) et dans sa traduction (Sanford et *al.*, 2004).

D'autres études menées sur le facteur ASF/ASF2 ont mis en évidence son rôle dans la prévention de l'instabilité génomique et dans la mort cellulaire en empêchant la formation de R-loops (générés durant la transcription) qui seraient responsables de cassures doubles brins dans l'ADN chromosomique et donc sujet à des recombinaisons homologues (Li et Manley., 2005). En effet, la surexpression de la RNase HI chez des mutants délétés d'ASF/ASF2 restaure tous les problèmes reliés à l'instabilité génomique comme l'hyper-recombinaison.

c) Changement de classe des chaînes lourdes des immunoglobulines

Les lymphocytes B sont les cellules responsables de la production d'anticorps (ou immunoglobulines). Afin d'adapter au mieux la défense de l'organisme contre de nouveaux organismes pathogènes, les lymphocytes B doivent traverser plusieurs étapes permettant leur maturation. Les clones de lymphocytes B seront alors capables de produire d'autres classes d'immunoglobulines qui diffèrent selon la structure des domaines constants des chaînes lourdes mais qui conservent les mêmes régions variables que les IgM: les chaînes γ , α , μ , ε et δ correspondent respectivement aux immunoglobulines IgG, IgA, IgM, IgE et IgD. Chacune de ces classes d'immunoglobulines a un rôle bien spécifique.

Ce mécanisme de commutation de classe ou switch d'isotype fait intervenir des régions appelées « régions S » (pour switch) situées en amont de chaque exon propre à un type d'immunoglobuline (Yu et Lieber., 2003, Selsing., 2006, Basu et *al.*, 2007, Chaudhuri et *al.*, 2007). La formation d'une boucle de délétion entre 2 régions S permet l'excision de l'exon μ (ou de plusieurs exons) aboutissant à la commutation des classes des immunoglobulines. Ces régions S serviraient de signaux de recombinaison utilisés pour la commutation des classes des immunoglobulines.

Ces régions S ont une taille moyenne de quelques kilobases et sont G-riches sur le brin non codant. Il a déjà été démontré que la transcription *in vitro* et *in vivo* de ces régions génère des R-loops (Daniels et Lieber., 1995; Yu et Lieber., 2003, Yu et *al.*, 2003, Yu et *al.*, 2005, Yu et *al.*, 2006, Huang et *al.*, 2006, Huang et *al.*, 2007). La

majorité de ces régions G-riches sont regroupées en clusters et il s'est avéré que la quantité de R-loops était proportionnelle à la quantité de cluster même si la densité en bases G reste constante. De plus, l'ajout de RNase T1 (dégrade l'ARN simple brin spécifiquement au niveau des bases G) durant la transcription de ces régions S empêche la formation de R-loops (Roy et *al.*, 2008).

Le mécanisme de commutation de classe des immunoglobulines nécessite la présence d'une cytidine désaminase ou « AID » (Activation-Induced Deaminase) synthétisée chez les lymphocytes B stimulés. Cette cytidine désaminase est connue pour reconnaître et se fixer uniquement sur une région simple brin (Bransteitter et *al.*, 2003, Petersen-Mahrt et *al.*, 2002, Yu et *al.*, 2004). Il serait donc possible que le R-loop soit la cible de l'AID.

d) Inhibition de l'expression génique durant l'élongation de la transcription

A ce jour, quelques études ont démontré que la présence de R-loops durant la transcription pouvait bloquer la progression des ARN polymérases surtout pour les gènes activement transcrits.

Chez *Escherichia coli*, il avait été observé que les mutants *topA*⁻, poussaient relativement bien grâce à la présence de mutations compensatoires dans les gènes *gyrA* et *gyrB* (Pruss et *al.*, 1982). La présence de R-loops chez les mutants *topA*⁻ a été démontré à la fois *in vivo* et *in vitro* lorsque la gyrase était rendue totalement active (Massé et *al.*, 1997, Phoenix et *al.*, 1997, Massé et Drolet., 1999b). Ces cellules présentaient à la fois une grande sensibilité aux stress et donc un défaut de croissance, abolit en partie lorsque la RNase HI était surexprimée (Drolet et *al.*, 1995, Massé et Drolet., 1999).

A l'époque, ceci laissait supposer que les R-loops générés chez ces mutants, avaient un effet inhibiteur sur l'expression génique notamment en bloquant la transcription et donc la synthèse des ARNm. Plus tard, des expériences de transcription *in vivo* et *in vitro* menées chez des mutants *topA*⁻, à partir de régions G/C riches comme l'opéron *rrnB*, connu pour former des R-loops en absence de topoisomérase I (Massé et *al.*, 1997) ont montré clairement que l'élongation de la transcription des opérons *rnn* était bloquée chez ces mutants et que seule la surexpression de RNase HI permettait de rétablir une élongation normale et adéquate de la transcription (Hraiky et *al.*, 2000) (figure 21).

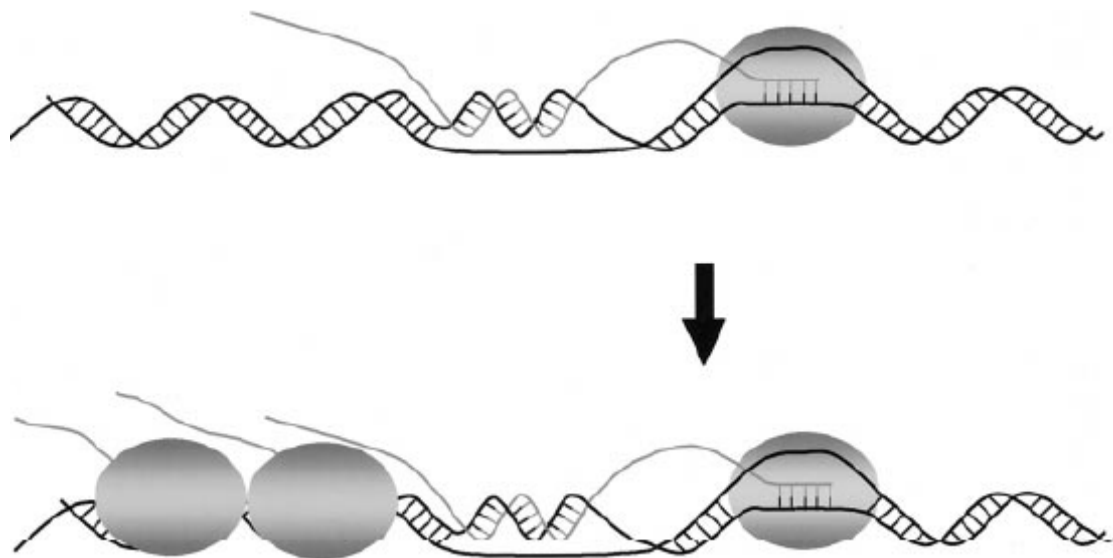


Figure 21 : modèle proposé du mécanisme de blocage de l'élongation de la transcription par des R-loop (Hraiky et *al.*, 2000).

En somme, chez *E. coli*, la topoisomérase I joue un rôle important en prévenant la formation des R-loops responsables du blocage de la progression des ARN polymérase durant la transcription active de certains gènes.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les mutants $\Delta Hpr1$ incapables d'exprimer le complexe THO présentaient un grave problème d'élongation de la transcription (Chávez et Aguilera., 1997, Piruat et Aguilera., 1998, Chávez et *al.*, 2000) mais également la présence de R-loops formés de manière co-transcriptionnelle (Huertas et Aguilera., 2003). En effet, chez ces mutants, la simple synthèse d'ARNm pouvait diminuer efficacement l'élongation de la transcription.

Afin d'étudier les conséquences de la taille de l'ARN sur l'élongation de la transcription chez ces mutants $\Delta Hpr1$ versus des cellules de type sauvage, des fusions ont été réalisées où un ribozyme à tête de marteau inactif (rib^{m}) ou non (rib^+), a été placé, entre une séquence PHO5 et la séquence lacZ sous le contrôle du promoteur GAL1. Une fois le ribozyme actif transcrit, il s'autoclive pour aboutir à 2 ARNm différents. L'un contenant l'ARNm de PHO5 et l'autre l'ARNm du rib^+ -lacZ. Pour le ribozyme rendu inactif, la transcription aboutissait à un ARNm plus long PHO5- rib^{m} -lacZ (Huertas et Aguilera., 2003). Il a été prouvé que le blocage de l'élongation de la transcription chez

les mutants $\Delta Hpr1$ dépendait de la taille des ARNm transcrits puisque l'élongation de la transcription était totalement rétablie lorsque le ribozyme s'autoclivait. Des expériences de transcription *in vitro* chez des mutants THO ont également montré que des hybrides stables d'ADN-ARN longs de 300 nucléotides réduisaient de moitié l'élongation de la transcription (Tous et Aguilera., 2007).

Finalement, grâce à toutes ces expériences, un modèle a été proposé dans lequel le R-loop formé en arrière de l'ARN polymérase agirait comme un barrage pour les ARN polymérases qui suivraient. La synthèse d'ARN serait alors partiellement inhibée.

II. Résultats

Hypernegative supercoiling inhibits growth by causing RNA degradation.

Imad Baaklini¹, Valentine Usongo¹, Flora Nolent¹, Patrick Sanscartier¹, Chadi Hraiky¹, Karl Drlica² and Marc Drolet^{1,3}. (2008) *Journal of Bacteriology*, **190** (22), 7346-56.

¹ Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, P. Québec, Canada, H3C 3J7

²Public Health Research Institute, New Jersey Medical School, Newark, NJ

³Corresponding author.

Phone : (514) 343-5796

FAX : (514) 343-5701,

Running title: Supercoiling and growth inhibition

Key words : supercoiling, *topA*, topoisomérase I, gyrase, RNase HI

Contributions

Pour les études menées dans cet article, j'ai réalisé l'expérience de transcription *in vitro* présentée à la figure 8 où l'on observe la formation de R-loops non spécifiques lorsque l'ADN hypersurenroulé négativement est transcrit. Ce résultat clé est à la base du modèle proposé dans lequel l'accumulation d'ADN hypersurenroulé négativement chez une cellule de type sauvage mène à la formation de R-loops non spécifiques et à la dégradation des ARNs. J'ai effectué en parallèle, d'autres expériences de transcription *in vitro* sur des densités croissantes de surenroulement d'ADN issues de 2 séquences qui diffèrent entre elles de par leur richesse en cytosines et guanines. Ces expériences ont permis d'établir le niveau seuil de surenroulement requis pour la formation de R-loops non spécifiques (Cf figure en appendice).

Résumé

Chez *Escherichia coli*, l'hypersurenroulement négatif induit durant la transcription est la signature des mutants déficients en topoisomérase I (*topA*). Cependant, sa signification physiologique demeure obscure. La chute de température provoque en parallèle, un arrêt sévère de la croissance et une augmentation de l'hypersurenroulement négatif. Ces deux propriétés étaient atténuées par la surexpression de RNase HI mais demeuraient plus sévères lorsque la température était basse. Alors que les ribosomes extraient durant l'arrêt de croissance montraient une activité normale, l'ARNm fixé à ces derniers étaient en quantité réduite pour *fis* et plus court pour *crp*; les polysomes demeuraient beaucoup moins abondants que les monosomes, le niveau de synthèse protéique chutait tout comme le ratio des protéines à haut poids moléculaires contrairement aux plus petites. L'altération de la maturation et de la dégradation des ARNm de *lacA* et *fis* étaient également observés. Ces résultats supportent la dégradation des ARNm durant l'arrêt de croissance. Ces effets n'étaient pas affectés par la mutation du gène codant pour la RNase E, indiquant que cette endonucléase n'était pas impliquée dans la maturation anormale des ARNm. L'utilisation de spectinomycine, un inhibiteur de la synthèse protéique, ne changeait rien, ce qui confirmait que la synthèse d'une ribonucléase n'était pas induite. La transcription *in vitro* révèle que la formation de R-loop est plus importante lorsque l'ADN matrice est hypersurenroulé négativement. Ces résultats nous permettent pour la première fois de présenter un modèle dans le lequel l'hypersurenroulement négatif inhibe la croissance. Dans ce modèle, l'introduction de l'hypersurenroulement négatif via la gyrase facilite la dégradation de l'ARN naissant; la surexpression de RNase HI limite l'accumulation de l'hypersurenroulement négatif afin de prévenir une dégradation extensive de l'ARN.

Abstract

Transcription-induced hypernegative supercoiling is a hallmark of *E. coli* topoisomerase I (*topA*) mutants. However, its physiological significance has remained unclear. Temperature downshift of *topA* mutants gave transient growth arrest and a parallel increase in hypernegative supercoiling that was more severe with lower temperature. Both properties were alleviated by overexpression of RNase HI. While ribosomes in extracts showed normal activity when obtained during growth arrest, mRNA on ribosomes was reduced for *fis* and shorter for *crp*, polysomes were much less abundant relative to monosomes, and the protein synthesis rate dropped, as did the ratio of large to small proteins. Altered processing and degradation of *lacA* and *fis* mRNA was also observed. These data are consistent with truncation of mRNA during growth arrest. These effects were unaffected by a mutation in the gene encoding RNase E, indicating that this endonuclease is not involved in the abnormal mRNA processing. They were also unaffected by spectinomycin, an inhibitor of protein synthesis, which argued against induction of ribonuclease activity. *In vitro* transcription revealed that R-loop formation was more extensive on hypernegatively supercoiled templates. These results allow us, for the first time, to present a model by which hypernegative supercoiling inhibits growth. In this model, the introduction of hypernegative supercoiling by gyrase facilitates degradation of nascent RNA; overproduction of RNase HI limits the accumulation of hypernegative supercoiling, thereby preventing extensive RNA degradation.

Introduction

DNA supercoiling is tightly regulated by opposing enzymatic activities in bacterial cells. DNA gyrase, encoded by *gyrA* and *gyrB*, introduces (12, 13) and maintains (8) negative supercoiling, while topoisomerase I (*topA*) and topoisomerase IV (*parC* and *parE*) remove excess negative supercoiling (37, 41, 49). Too much negative supercoiling can be detrimental to cell growth, as initially revealed by genetic studies in which *topA* null mutants of *Escherichia coli* were found to carry compensatory *gyrA* or *gyrB* mutations that reduced chromosomal supercoiling (7, 37). Plasmid DNA extracted from these *topA* null mutants had very high levels of negative supercoiling (35). pBR322 topoisomers that could not be resolved by conventional agarose gel electrophoresis in the presence of chloroquine, a DNA-intercalating dye, were described by the term “hypernegative supercoiling” (35). Such topoisomers had a superhelical density that was more than twice the average seen with wild-type cells (35).

Hypernegative supercoiling was attributed to transcription of the *tetA* gene on pBR322 (36) and was explained by the twin-domain model in which a moving transcription complex generates negative supercoiling behind the complex and positive supercoiling in front of the complex (22). By removing the positive supercoils in the absence of topoisomerase I, DNA gyrase generates hypernegatively supercoiled DNA. Hypernegative supercoiling is particularly evident in plasmids carrying genes encoding membrane-bound proteins such as TetA (23, 25), presumably because coupled transcription-translation and membrane anchorage of nascent protein restrict DNA rotation. A requirement for membrane anchorage is bypassed if coupled transcription-translation originates from very strong promoters, such as the hybrid Tac promoter (40) or, as shown more recently, from a promoter recognized by T7 RNA polymerase (38). In each of these cases, the physiological significance of hypernegative supercoiling is unclear, as no phenotype is attributed to it. More importantly, hypernegative supercoiling is observed under conditions permissive for the growth of *topA* null mutants.

In contrast, when cells are downshifted from 37 to 28 °C and below, hypernegative supercoiling in *topA* null mutants correlates with growth inhibition (28, 30). This is most evident when *topA* null cells also carry a *gyrB*(Ts) allele that allows gyrase re-activation after temperature downshift (28, 30). In this situation, hypernegative supercoiling depends on transcription, but not translation. Moreover, it is not restricted to genes expressed from very

strong promoters. Instead, downshift-based hypernegative supercoiling is related to R-loop formation coupled to gyrase activity (10, 29, 33). Overproduction of RNase HI, an enzyme that degrades the RNA of R-loops, compensates for the growth defects of *topA* null mutants and reduces hypernegative supercoiling associated with temperature downshifts (11).

We recently used *topA* null *gyrB*(Ts) strains to study the physiological consequences of temperature downshifts in the absence of topoisomerase I (2). Transient growth inhibition correlated with both a reduction in rate of protein synthesis and with accumulation of truncated RNAs at the expense of normal full-length RNAs, phenotypes that were corrected by RNase HI overproduction (2). Since supercoiling measurements were not included in this work, whether and how these phenotypes are related to hypernegative supercoiling is unknown. The effect of RNase HI overproduction was explained in the context of local transcription-induced negative supercoiling without considering the global supercoiling level during the temperature downshift. We proposed that transcription-induced negative supercoiling promoted R-loop formation. The R-loops, when not removed rapidly by RNase HI, might act as roadblocks for subsequent transcribing RNA polymerases, thereby leading to accumulation of shorter than full-length RNAs (2). According to this model, RNase HI overproduction, by continuously removing R-loops, would lead to substantial RNA degradation, which was not the case (2). Moreover, R-loops might turn over too rapidly to act as roadblocks for the majority of genes, since most *E. coli* genes are transcribed at low rates (45). Thus an alternate explanation is required.

The present study showed that RNA degradation associated with hypernegative supercoiling was probably responsible for the growth inhibition of *topA* null mutants. By limiting the accumulation of hypernegative supercoiling, RNase HI overproduction prevented RNA degradation. When the level of RNase HI was low, as in wild-type cells, hypernegative supercoiling accumulated, which led to extensive R-loop formation and RNA degradation. Thus, cells unable to keep supercoiling from reaching unacceptably high levels are compromised in the ability to grow due to extensive RNA degradation.

Materials and Methods

***E. coli* strains and plasmids.** *Escherichia coli* strains used in this work are described in Table 1. The *rneA14* derivatives of RFM445 and RFM475 were constructed by transduction with P1_{vir} phage (32) grown on AC28 (MC1061, *zce-726::Tn10*, *rneA14* (aa 636-845), obtained from A.J. Carpousis; 19). Tetracycline resistant transductants were selected, and the presence of the *rneA14* mutation was confirmed by PCR using the RNE1 d(CTGGAAATGTCCCGTCAG) and RNE2 d(CACTTCCGGTTGCGGTTC) oligonucleotides. The chromosomal *lac* fusion was obtained by using the system previously described by Simons *et al.* (39). pMD217 has been previously described (31). This pTrc99a derivatives contain a *boxA* antitermination regulatory sequence inserted immediately downstream of the IPTG-inducible *P_{trc}* promoter. Oligonucleotides d(GCATAGATCTGCATTTACGTTGACACC) and d(CTGAAGATCTATCCGCCAAAACAGCC) were used in a PCR reaction (Pfu polymerase from Stratagene) with pMD217 to amplify a DNA segment located between nucleotides 2982 and 327 of the pTrc99a sequence. This region also includes the *lacI^f* gene. The PCR product was digested with BglII (BglII sites are present in both oligonucleotides) and cloned in pRS550 digested with BamHI to place the *lac* operon of pRS550 under the control of the *P_{trc}* promoter. Sequencing was performed to confirm the integrity of the fusion. The fusion was transferred to the chromosome by using λ RS45 phage as described (39). Single copy integrations were confirmed by PCR as previously performed (34). pSK760 is a pBR322 derivative carrying the wild-type *rnhA* gene (11). pEM001 and pEM003 are pACYC184 derivatives that carry, respectively, the wild-type *rnhA* gene, or a mutated and inactive version of this gene (31). pMD306 is a pMD217 derivative carrying the 567 bp HindIII fragment from the *rrnB* operon downstream of the *P_{trc}* promoter (31).

Media and growth conditions. Cells were grown in VB Casa (Vogel-Bonner) minimal medium (11) supplemented with casamino acids (0.1%), glucose (0.2%), required amino acids (0.5%), thiamine (5 μ g/ml), thymine (10 μ g/ml). When needed, kanamycin was added to 25 μ g/ml, chloramphenicol to 30 μ g/ml, tetracycline to 10 μ g/ml and ampicillin to 50 μ g/ml.

Preparation of S30 extracts and *in vitro* translation experiments. S30 extracts from cells grown at 37 °C and transferred or not to 28 °C for 20 minutes, were prepared as described previously (27), aliquoted and stored at -80°C. *In vitro* translation experiments using the S30 extracts were performed essentially according to a protocol from Promega (Technical bulletin TB219). The equivalent of 0.6 A₂₆₀ of S30 extracts were used in the *in vitro* translation reactions with either 4 µg of phage MS2 RNA template (from Roche Applied Sciences) or 10 µg of poly(U) RNA template (from GE Healthcare). When MS2 mRNA template was used, the reaction contained 20 µl of the S30 premix solution without amino acids (Promega), 15 µCi (1µl) of L-[³⁵S] methionine (GE healthcare) and 5 µl of the amino acids minus methionine mix (Promega). When poly(U) RNA template was used, the reaction contained 20 µl of the S30 premix solution without amino acids (Promega) and 0.25 µCi (5µl) of L-[¹⁴C]phenylalanine (GE Healthcare). To measure the translation background activity in the S30 extracts, MS2 mRNA and poly(U) RNA were omitted in some reactions. After 1 hour of incubation at either 37 °C or 28 °C, 3 ml of NaOH (1M) were added and the reactions were incubated on ice for 10 minutes. The reaction products were precipitated by adding 10 ml of an ice-cold solution containing 25% TCA (Trichloroacetic acid) and 2% casamino acids, and by incubating the tubes on ice for 30 minutes. The samples were deposited on 25 mm GF/B glass microfibre filters (Whatman), washed 3 times with 5% TCA and twice with 95% ethanol by using the Millipore 1225 sampling manifold system (Millipore). The filters were then dried at room temperature for 10 minutes. Filters were transferred to vials containing 10 ml of Cytosint (MP Biomedicals) and L-[³⁵S] methionine or L-[¹⁴C]phenylalanine incorporation was measured in a scintillation counter (Beckman LS 6000 SC).

Sucrose density gradient fractionation of ribosomes and mRNA analysis. Cells were grown to log phase (OD₆₀₀ of ~0.5- 0.6) at 37 °C and transferred to 28 °C for 20 minutes. After exposure to 400 µg of chloramphenicol for 2 minutes, the cells were chilled briefly on ice and pelleted by centrifugation at 4000 rpm for 20 minutes at 4 °C (Beckman J2-MI, JA-14 rotor). They were then resuspended in 10 ml of lysis buffer without lysozyme (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 60 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20% sucrose), centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes at 4 °C, resuspended in 500 µl of lysis buffer containing lysozyme (5 mg/ml) and stored at -80 °C. The cells were lysed by three rounds of freeze-thaw. 100 µl of 1% sodium deoxycholate, 50 µl

of 6% Brij-58 and 20 units of RNase free DNase I (Roche Applied Sciences) were added to the lysates before incubating them on ice for 10 minutes. The lysates were clarified by centrifugation at 13000 rpm for 15 minutes at 4 °C. The equivalent of 35 OD₂₆₀ units were layered on 10-40% sucrose gradients made in 20 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 100 mM NH₄Cl, 2 mM DTT and the gradients were centrifuged in a Beckman SW41 rotor at 35000 rpm for 3 hours at 4 °C. After centrifugation the gradients were connected to a density gradient fractionation system (ISCO), fractionated and recorded (ISCO UA-6 absorbance detector).

The gradients were fractionated into 1 ml fractions from which RNAs were recovered by first adding three volumes of 100% ethanol. After 1 hour at -80 °C, RNAs were pelleted by centrifugation at 13000 rpm for 15 minutes. The pellets were dried and resuspended in 50 µl of RNase-free deionized water. 300 µl of a solution made of 1.2 % SDS, 2.3 mM EDTA, 46.6 mM Na-Acetate pH 5.5 and 100 µg of proteinase K (Roche Applied Sciences) were then added before the mixtures were incubated for 30 minutes at 65 °C. RNAs from the mixtures were obtained by means of phenol chloroform (1:1) extraction and ethanol precipitation. Each RNA preparation was dissolved in 20 µl of RNase-free deionized water and stored at -80 °C. Northern blots were performed as described (14). The membranes were probed with the appropriate random prime-labelled DNA fragments obtained by PCR by using d(GGACGTCACATTACCGTGC) and d(GCACGTACCCATGCGCTACG) oligonucleotides for *crp*, d(GGCTGGCATTACAGACAG) and d(CTCTTCGCAGTTACGGTG) oligonucleotides for *yhdG*, and d(GAGCTGACAGAACTATGT) and d(CGCAGCGTACCACGGTTG) oligonucleotides for *fis*. Bands were detected by using a Phosphorimager Typhoon 9400 (GE Healthcare) with the ImageQuant image analysis software (Molecular Dynamics).

Time course of L-[³⁵S]cysteine incorporation. Cells were grown to log phase (OD₆₀₀ of ~0.5-0.6) at 37 °C and transferred to 28 °C. After 20 minutes of incubation, 10 µCi/ml of L-[³⁵S]cysteine (GE Healthcare) were added to the cells. Aliquot of cells (500 µl) were recovered at various times as indicated and mixed with the same volume of cold non-radioactive cysteine (0.5%). After 10 minutes on ice the cells were recovered by centrifugation and resuspended in sodium dodecyl sulphate (SDS) loading buffer for lysis by boiling. The proteins were separated by SDS-polyacrylamide (10 %) gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose

membrane (Hybond-ECL, GE Healthcare). Bands were detected and quantified by using a Phosphorimager Typhoon 9400 (GE Healthcare) with the ImageQuant image analysis software (Molecular Dynamics).

Plasmid extraction for supercoiling analysis. Cells were grown overnight at 37 °C and diluted to an OD₆₀₀ of 0.06 in prewarmed medium. They were grown to an OD₆₀₀ of ~0.5 at which time an aliquot of cells was recovered for plasmid extraction while the remaining culture was transferred to the indicated temperature. Aliquots of cells were recovered for plasmid extractions at various times as indicated. Growth was arrested by transferring cells into a tube filled with ice, thus immediately lowering the temperature of the culture to 0 °C. Plasmid DNAs were extracted by alkaline lysis as previously described (31).

Plasmid topoisomer analysis. Agarose gel electrophoresis in the presence of chloroquine was performed in 0.5 x TBE as described previously (31). After electrophoresis, the gels were dried and prepared for *in situ* hybridization (31) with a random prime-labelled probe corresponding to the *bla* gene of pMD306. Band densities of topoisomers were quantified using a Phosphorimager Typhoon 9400 (GE Healthcare) with the ImageQuant image analysis software (Molecular Dynamics).

RNA extraction from cell cultures. RNA extraction from growing cells was performed by using TRIZOL reagent (Invitrogen) as described (2). Northern blots of RNA samples separated by electrophoresis in 1.2 % agarose gels containing formaldehyde were performed as described (14). End-labelled FIS 3' oligonucleotide (2) was used to detect *fis* mRNA (Fig. 5). *lacZ* mRNA was detected by using a random prime-labelled probe obtained by PCR using the oligonucleotides LACPCR5, d(CCGTCATAGCGATAACG) and LACPCR3, d(GCTGTTGACTGTAGCGG). *lacA* mRNA was detected by using a random prime-labelled probe obtained by PCR using the oligonucleotides LACA5', d(GATCGCATTGAACATGCC) and LACA3', d(CCGGTCGTTTATTTCGCG). Bands were detected by using a Phosphorimager Typhoon 9400 (GE Healthcare) with ImageQuant image analysis software (Molecular Dynamics).

R-loop formation *in vitro*. pJP461 (33) and pTW120 (48) were purified from DH5 α cells by using the Plasmid Midi Kit (Qiagen). Hypernegatively supercoiled templates were prepared by transcription in the presence of DNA gyrase (John Innes Enterprises Ltd) as described (33). Following electrophoresis in agarose gel containing 7.5 μ g/ml chloroquine, we were able to estimate that more than 90% of the topoisomers were hypernegatively supercoiled (migration at the bottom of the gel as unresolved topoisomers). Transcription reactions (25 μ l) in 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT and 0.5 mg/ml BSA were performed in the presence of 20 units of T3 or T7 RNA polymerase (USB), 0.5 μ g of template DNA, 0.4 mM of each NTP and 2 μ Ci of both [³²P]-ATP and [³²P]-UTP (GE Healthcare, 3000 Ci/mmol). When indicated, RNase HI (20 ng) was added. Transcription reactions were incubated at 37 °C for 15 minutes. They were stopped by adding EDTA to 20 mM final. Samples were treated with 250 ng of RNase A for 1 hour at 37 °C. After phenol extraction, the samples were loaded on agarose gels (1%) in TBE buffer for electrophoresis. After staining with ethidium bromide and photography under UV light, gels were dried and exposed to a storage phosphor screen and RNA bands were revealed by using a Phosphorimager Typhoon 9400 (GE Healthcare) with ImageQuant image analysis software (Molecular Dynamics).

Results

Growth rate of a *topA* null *gyrB*(Ts) mutant at low temperature correlates with restricted accumulation of hypernegatively supercoiled DNA.

To better understand the physiology of *topA* null cells following temperature downshifts, supercoiling levels must be measured at regular intervals during and after the transient growth inhibition. Indeed, still unknown is if the eventual growth resumption of *topA* null *gyrB*(Ts) cells accompanied by the accumulation of full-length RNAs (2) is related to changes in supercoiling levels. This question is also worth addressing considering the fact that GyrB proteins should remain active throughout incubation at low temperatures after the downshift. It is therefore possible that hypernegative supercoiling persists following the downshift, thus suggesting that it is not directly related to growth inhibition. On the other hand, if hypernegative supercoiling is directly involved in growth inhibition, it should be relaxed when growth resumes.

We asked whether transient growth inhibition is related to hypernegative supercoiling by comparing two $\Delta topA$ *gyrB* (Ts) strains, VU7 and VU8, after a shift from the permissive temperature of 37 °C to 28 °C. Strain VU7 expresses RNase HI from plasmid pEM001; VU8 carries the vector pEM003 that has a mutated, inactive *rnhA* gene. As a supercoil reporter, both strains carry pMD306 (pMD306 contains the *lacI^f* gene, which stimulates R-loop-dependent hypernegative supercoiling; 4). Cell growth was monitored, and plasmid DNA was extracted at various times before and after temperature downshift. To observe hypernegative supercoiling, DNA samples were subjected to agarose gel electrophoresis in the presence of the DNA intercalator chloroquine. Topoisomers of pMD306 were then detected by hybridization with a specific probe. Temperature downshift caused a transient growth arrest (Fig. 1a, squares) and transient accumulation of hypernegative supercoils when RNase HI was not overproduced (strain VU8). Growth resumed 2 hrs after the shift, and the level of hypernegatively supercoiled DNA dropped. Overproduction of RNase HI (strain VU7) prevented significant accumulation of hypernegatively supercoiled DNA and growth inhibition (Fig. 1a, diamonds).

A more severe shift to 26 °C led to a greater accumulation of hypernegative supercoiling. Growth inhibition was similar to that observed at 28 °C but with a slightly longer lag (Fig. 1b, RNase HI not overproduced, squares). As seen with the shift to 28 °C, resumption

of growth was accompanied by relaxation of hypernegatively supercoiled DNA. At 26 °C, overproduction of RNase HI failed to completely eliminate excess negative supercoiling, and the growth rate of the *topA* null strain (diamonds) was slightly lower than that of strain RFM445 (triangles), the isogenic *topA*⁺ *gyrB*(Ts) derivative.

In an even more severe shift to 21 °C, growth of the *topA* null strain not overproducing RNase HI (VU8) failed to resume, and the high level of hypernegatively supercoiled DNA persisted (Fig. 1c). In this case, overproduction of RNase HI (VU7) slightly reduced the proportion of hypernegatively supercoiled topoisomers, and cells grew, albeit at a significantly lower rate than seen with the isogenic *topA*⁺ *gyrB*(Ts) strain (Fig. 1c). Thus, the transient inability of downshifted *topA* null *gyrB*(Ts) cells to grow and accumulate full-length RNAs was related to hypernegative supercoiling. The ability of RNase HI to correct these problems was linked to its capacity to restrain hypernegative supercoiling.

Failure to accumulate full-length RNAs during growth inhibition of *topA* null *gyrB*(Ts) mutants at low temperature. We previously showed that rRNA synthesis can be defective in *topA* null *gyrB*(Ts) mutants (14). Since rRNA transcription and ribosome biogenesis are linked (5, 20), defective ribosomes could render RNA susceptible to ribonucleases, thus leading to RNA degradation (17). We examined the possibility that ribosomes of *topA* null *gyrB*(Ts) mutants were defective by measuring protein synthesis in S30 extracts from both *topA* null *gyrB*(Ts) and isogenic *topA*⁺ *gyrB*(Ts) cells. Cells were grown to log phase at 37 °C, and half of each culture was transferred to 28 °C. Translation initiation and elongation in S30 extracts were measured by following either L-[³⁵S]methionine or L-[¹⁴C]phenylalanine incorporation with phage MS2 RNA or poly(U) RNA, respectively, as templates. No significant difference was seen between the strains irrespective of temperature (data not shown). We conclude that ribosomes of *topA* null *gyrB*(Ts) cells are fully functional.

To further examine RNA features associated with growth inhibition, we examined *yhdG-fis* and *crp* mRNA (2). Previous work with whole-cell extracts showed that the *yhdG-fis* operon was overexpressed in the *topA* null *gyrB*(Ts) mutant at the low, non-permissive temperature and that RNAs corresponding to the proximal *yhdG* gene accumulated, whereas RNAs from the distal *fis* gene were barely detectable (2). In the *topA*⁺ strain or in the *topA* null mutant overproducing RNase HI, *yhdG-fis* operon expression was lower, but RNA

corresponding to the distal *fis* gene was more abundant than RNA from the proximal *yhdG* gene (2).

To assess translatable RNA we used probes to detect RNA corresponding to the proximal *yhdG* gene and the distal *fis* gene in various ribosome fractions displayed by sucrose density-gradient centrifugation. The top panels of Fig. 2a show sedimentation profiles with the numbers indicating monosomes (1, one ribosome per mRNA) and polysomes (2, 3, 4; two or more ribosomes per mRNA). The relative distribution of *yhdG* RNA in the fractions was similar in all strains. Fig. 2b shows that *fis* RNA was easily detected in the ribosome fractions of both the *topA*⁺ strain and the *topA* null strain overproducing RNase HI, but such RNA was absent in fractions from the *topA* null strain not overproducing RNase HI. When present, *fis* RNA (Fig. 2b), but not *yhdG* RNA (Fig. 2a), was mostly found associated with the ribosomes (monosomes and polysomes), which probably reflects a stronger ribosome binding site for *fis* RNA (a strong ribosome binding site is expected for a gene encoding a very abundant protein such as Fis). Thus, less *fis* RNA was ribosome-associated in cells undergoing growth inhibition.

The *crp* gene was previously found to be expressed at the same level in all strains at the non-permissive temperature (2). However, in the *topA* null strain not overproducing RNase HI, full-length *crp* mRNA was barely detected, while short stable RNAs corresponding to the 5' portion of the gene accumulated. Fig. 3 shows the presence of *crp* RNA in the ribosome fractions of both *gyrB*(Ts) and *topA gyrB*(Ts) strains, but with much shorter RNA species detected in the ribosome fractions from the *topA* null strain not overproducing RNase HI (middle panel, lanes 5 to 12). When RNase HI was overproduced, longer RNAs were detected (right panel, lanes 5 to 12).

Figs. 2 and 3 also show that the ribosome profiles of the *topA* null *gyrB*(Ts) strain not overproducing RNase HI were very different from those of the other strains. Indeed a much larger proportion of monosomes were observed; polysomes were barely visible. This result indicated the presence of shorter translation-competent RNAs in the *topA* null *gyrB*(Ts) cells at the low, non-permissive temperature. In agreement with this interpretation, the preferential accumulation of monosomes was also observed when cellular RNA was extensively degraded due to overproduction of the endoribonuclease MazF in *E. coli* cells (50).

The failure to accumulate full-length RNAs suggested that protein synthesis would be inhibited in downshifted *topA* null *gyrB*(Ts) cells. In addition, the accumulation of short translatable RNAs at the expense of longer ones would favor the synthesis of small proteins over larger ones, as previously observed in cells overproducing the MazF (50) or ChpBK (51) endoribonucleases. To examine protein synthesis, proteins were labelled by adding L-[³⁵S]cysteine to the cell cultures at 28 °C. Proteins were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. We confirmed the previous finding (2) that protein synthesis rate is reduced in downshifted *topA* null *gyrB*(Ts) cells (data not shown). Fig. 4a shows one set of gels that was representative of three independent experiments. Ratios of large to small proteins were obtained by quantifying band intensities in all lanes in the two areas delimited by the brackets labelled large and small (Fig. 4a, left). Fig. 4b shows the results of the three independent experiments and demonstrates that the absence of topoisomerase I reduced the large/small ratio of proteins by about 40% at non-permissive temperature (compare squares, *topA*⁺ *gyrB*(Ts) with triangles, *topA* *gyrB*(Ts), for times 60 to 180 sec).

Collectively, the data indicate that a failure to accumulate full-length RNAs caused a shortage of appropriate templates in *topA* null *gyrB*(Ts) cells, thereby leading to protein synthesis impairment and growth inhibition.

Incorrect processing and degradation of *fis* and *lac* RNAs in *topA* null *gyrB*(Ts) mutants at low temperature. An inability to accumulate full-length RNAs might be related to either premature termination of transcription or to RNA degradation. In previous work, 5' proximal probes were used to address the possibility that *topA* null *gyrB*(Ts) cells synthesize truncated RNAs at the non-permissive temperature (2). Here, we used probes corresponding to internal regions of *yhdG-fis* and *lac* operons to address the possibility that RNA is synthesized but degraded in *topA* null *gyrB*(Ts) cells at the non-permissive temperature.

yhdG-fis RNA is normally processed by an endonucleolytic cleavage to generate two RNA species in which the longer one corresponds to *fis* and the shorter one to *yhdG* (3). To follow the processing of *yhdG-fis* RNA at the non-permissive temperature, rifampicin was added to cell cultures previously transferred to 28 °C, and RNA was extracted at various times. RNA was then probed with an oligonucleotide corresponding to the 3' end of the *fis* gene. As expected, *yhdG-fis* RNA was processed to give the RNA carrying *fis* both in *topA*⁺ (Fig. 5,

lanes 1 to 6) and in *topA*⁻ cells overproducing RNase HI (Fig. 5, lanes 13 to 18). However, in *topA*⁻ cells not overproducing RNase HI, *yhdG-fis* RNA was more slowly processed, a smear was clearly visible, and the RNA corresponding to *fis* was barely detected (Fig. 5, lanes 7 to 12). Thus, *fis* RNA was synthesized in *topA*⁻ cells not overproducing RNase HI, but it was incorrectly processed.

We previously used 5' probes to demonstrate that *topA* null *gyrB*(Ts) cells accumulate truncated *lacZ* RNAs at the non-permissive temperature (2). In agreement with this finding, β -galactosidase synthesis was dramatically reduced in these cells. Here, we used a random-primed probe corresponding to the 3' region of the *lacZ* gene to detect *lacZ* RNA degradation. To facilitate detection of *lac* RNAs by Northern blot analysis, we placed the *lac* operon under control of the strong IPTG-inducible *P_{trc}* promoter on the chromosome of isogenic strains. Fig. 6 (top panel) shows that *lacZ* RNA was synthesized but extensively degraded in *topA* null *gyrB*(Ts) cells when RNase HI is not overproduced (lane 2). We next followed the synthesis of *lacA*, the third and last member of the *lac* operon. *lacA* RNA is normally produced following successive endonucleolytic cleavages of *lac* RNA by RNase P and RNase E in the intergenic region between *lacY* and *lacA* (21). Fig. 6 (bottom panel) shows accumulation of correctly processed *lacA* RNA in *topA*⁻ cells overproducing RNase HI (lane 1). However, *lacA* RNA was detected as a smear in *topA*⁻ cells not overproducing RNase HI (lane 2). Thus, although *lac* RNA was synthesized in *topA*⁻ cells not overproducing RNase HI, it was not correctly processed and was degraded, as was the case for *fis* RNA. These data indicate that the failure to accumulate full-length RNAs in *topA* null *gyrB*(Ts) cells is due largely to altered processing and degradation. Extensive R-loop formation could inhibit normal RNA processing and instead lead to RNA degradation by RNase HI (see below and Discussion).

RNase E is not responsible for the extensive RNA degradation in *topA* null *gyrB*(Ts) mutants at low temperature. RNase E (*rne*) is the major endoribonuclease involved in RNA degradation in *E. coli* (18). To examine RNase E involvement in RNA degradation of *topA* null *gyrB*(Ts) mutants at non-permissive temperature, we introduced the *rneΔ14* mutation into isogenic *topA*⁺ and *topA*⁻ strains carrying the *lac* operon under control of the *P_{trc}* promoter (among viable *rne* mutations, *rneΔ14* is best able to stabilize the otherwise very unstable *lacZ* mRNA synthesized by T7 RNA polymerase (19)). The *rneΔ14* slightly

promoted the accumulation of RNA products hybridizing to the *lacA* probe in *topA*⁺ cells (Fig. 7, compare lane 1, *rne*⁺ with lane 3, *rneΔ14*). In *topA*⁻ cells, the *rneΔ14* mutation promoted accumulation of *lacA* degradation products but not normal *lacA* RNA (Fig. 7, compare lane 5, *rne*⁺ with lane 7, *rneΔ14*). Thus, RNase E does not initiate *lacA* RNA degradation in *topA* null *gyrB*(Ts) mutants at the non-permissive temperature. Similar results were obtained for *fis* RNA (not shown).

To examine whether extensive RNA degradation requires *de novo* synthesis of a ribonuclease following the temperature downshift, cells were treated with the translation inhibitor, spectinomycin, five min before transfer from 37 to 28 °C. Truncated *lacA* RNAs accumulated whether or not spectinomycin was added to cultures of both *rne*⁺ and *rneΔ14*-derivatives of *topA* null mutants (Fig. 7, compare lanes 5 and 7, minus spectinomycin with, respectively, lanes 6 and 8, plus spectinomycin). However, addition of spectinomycin caused a significant reduction in the amount of RNA detected with the *lacA* probe in all strains (Fig. 7, compare lanes 1, 3, 5 and 7, minus spectinomycin with, respectively, lanes 2, 4, 6 and 8, plus spectinomycin). We attribute this reduction to polarity effects (1, 46), which are expected to more severely affect *lacA*, the last gene of the operon. Moreover, in *topA*⁺ cells, the addition of spectinomycin strongly promoted the accumulation of larger RNA species (Fig. 7, compare lane 1 with lane 2, respectively minus and plus spectinomycin). This is in agreement with the previously described stabilizing effects of translation inhibitors on mRNAs due to the titration of RNase E, presumably by unstable rRNAs that are overproduced when protein synthesis is inhibited (24). Thus, extensive RNA degradation in *topA*⁻ cells does not require the *de novo* synthesis of a ribonuclease following the temperature downshift. Rather, the temperature downshift may lead to extensive accumulation of RNA substrates for a pre-existing ribonuclease, other than RNase E.

***In vitro* transcription of hypernegatively supercoiled templates leads to extensive R-loop formation.** The observation that growth resumption coincided with DNA relaxation suggested that hypernegative supercoiling is tightly linked to RNA degradation. Furthermore, DNA supercoiling can directly affect RNA features only by acting during transcription. Based on experimental evidence, we recently proposed a self-promoting cycle of R-loop formation involving gyrase and RNase HI that ultimately leads to hypernegative supercoiling. In this

model, transcription of hypernegatively supercoiled templates leads to extensive and non-sequence specific R-loop formation (9).

Two plasmids were examined that allowed transcription of a cloned DNA insert from either the physiological or the reverse orientation by the use of T7 or T3 RNA polymerase, respectively. Plasmid pJP461, which carries the 567 bp HindIII fragment of the *E. coli rrnB* operon, exhibits a small amount of R-loop formation in its physiological orientation (31, 33). A second plasmid, pTW120 (48), carries 41 highly G-rich repeats of the mouse Sy3 class switch region that allow efficient formation of stable R-loops (6, 15, 47, 48). Stable R-loops significantly formed on templates having wild-type supercoiling levels only when the 41 repeats of the mouse Sy3 class switch region were transcribed in their physiological, G-rich orientation, as shown by the RNase HI-sensitive gel retardation of pTW120 during electrophoresis (Fig. 8, top panel compare lane 11, - RNase HI with lane 12, + RNase HI). However, these R-loops were short since only a very faint plasmid-associated radioactive RNA signal was detected (Fig. 8, lane 11, bottom panel).

When hypernegatively supercoiled templates were transcribed, extensive R-loop formation occurred with each transcribed sequence (Fig. 8, lanes 5, 7, 13, and 15). This R-loop formation was accompanied by a strong radioactive RNA signal, reflecting the presence of long R-loops. A loss of preference for G-rich regions was indicated by the fact that R-loop formation was detected irrespective of the transcription orientation of the cloned DNA fragments and the RNA polymerase used (T3 or T7). Consequently, transcription of hypernegatively supercoiled DNA templates promotes extensive, sequence-independent R-loop formation. In this context, the presence of RNase HI could lead to extensive RNA degradation and could explain the failure of *topA* null *gyrB*(Ts) cells to accumulate full-length RNAs at the non-permissive temperature (see Discussion).

Discussion

Mechanism of growth inhibition by hypernegative supercoiling. Two pathways exist by which *topA* mutants acquire hypernegative supercoiling. One involves an imbalance between gyrase and the relaxing enzymes, topoisomerases I and IV that allows negative supercoils to accumulate due to restricted DNA rotation associated with transcription (twin-domain model). The other involves formation of RNase HI-sensitive R-loops behind transcription complexes. The latter appears to be involved in the transient accumulation of hypernegative supercoils and growth inhibition that occurs when a *topA* null mutant is shifted to low temperature. Overproduction of RNase HI alleviates both (Fig. 1). Accumulation of truncated RNAs at the expense of full-length functional RNAs then impaired protein synthesis and inhibited growth. When hypernegative supercoiling was relaxed, full-length functional RNAs accumulated, and growth resumed. As expected, restoration of the ribosome profile, i.e. the emergence of polysomes at the expense of monosomes, accompanied growth resumption (not shown). Thus the known sensitivity of *topA* null mutants to low temperature (30, 42) is due to accumulation of hypernegatively supercoiled DNA that then triggers RNA degradation.

Inhibition of topoisomerase IV significantly stimulated the accumulation of hypernegatively supercoiled DNA in *topA* null mutants, suggesting that this topoisomerase is involved in removal of hypernegative supercoiling (44). We found that hypernegative supercoiling becomes more stable as temperature decreases (Massé *et al.*, unpublished results). It may be that topoisomerase IV preferentially loses activity under these conditions. With various *topA* null strains containing or lacking compensatory mutations, we observed a correlation between growth inhibition and hypernegative supercoiling at low temperature (28, 30). The dissimilar extent of RNA degradation, determined by the level of hypernegative supercoiling present in these various strains, may explain their different growth rates.

The data presented above also explain the paradoxical observation that overproduction of RNase HI, an enzyme that degrades RNA, allows the accumulation of full-length RNAs. Overproduction of RNase HI limits the accumulation of hypernegatively supercoiled DNA, thereby preventing extensive RNA degradation. We have found that hypernegatively supercoiled DNA accumulates during a very short time interval following the downshift, after which it persists due to inefficient relaxation (Usongo *et al.*, unpublished results). Therefore, RNase HI activity must be high enough in the cell to efficiently inhibit hypernegative

supercoiling within a narrow time window. Although our *in vivo* and *in vitro* data suggest that RNase HI overproduction acts by preventing the formation of hypernegatively supercoiled DNA (10, 29, 31, 33), it may also promote the rapid removal of these topoisomers. For example, by limiting the formation of hypernegatively supercoiled DNA, RNase HI overproduction may prevent the saturation of topoisomerase IV activity, thereby facilitating relaxation of hypernegative supercoils.

Origin of RNA degradation. Although the exact mechanism that links hypernegative supercoiling to RNA degradation is not fully characterized, our data allow us to discard several possibilities. Experiments with the *rneΔ14* mutation indicated that RNase E is not responsible for the extensive RNA degradation occurring in the *topA* null *gyrB*(Ts) mutant at low temperatures. As expected, we found that the *rneΔ14* mutation did not improve the growth of this *topA* mutant (not shown).

In vitro transcription of hypernegatively supercoiled templates generated extensive, sequence-independent R-loop formation. Therefore hypernegative supercoiling in the *topA* mutant may also lead to extensive sequence-independent R-loop formation. RNA in the R-loops can then be degraded by RNase HI, thus explaining the failure to accumulate full-length RNAs and subsequent growth inhibition. Interestingly, fragments on the 3' side of RNase HI cleavage carry a monophosphorylated 5' terminus. Such RNAs are preferred substrates for the 5'-end-dependent RNase E, as opposed to mRNAs that normally have a triphosphorylated 5' terminus (26). This could explain the rapid degradation in the *topA* mutant of RNAs from *fis* and *lacA* that correspond to the distal part of polycistronic RNAs. This would also be compatible with the observation that the *rneΔ14* mutation significantly promoted the accumulation of truncated *lacA* RNAs in the *topA* mutant.

Fragments from the 5' side of RNase HI cleavage can be degraded from their 3' end by exoribonucleases such as PNPase and RNase II (18). Interestingly, we found that RNAs such as *yhdG* that correspond to the proximal part of operons tend to accumulate in *topA* null mutants at the non-permissive temperature (2, and Baaklini *et al.*, unpublished observation). The activity of the cellular exoribonucleases may become saturated due to the rapid degradation of RNAs by RNase HI. In agreement with this interpretation, we found that overproducing PNPase or RNase II reduced accumulation of RNAs that corresponded to the

proximal part of both monocistronic and polycistronic RNAs (Hraiky *et al.*, unpublished observation). Thus, the apparent 3' to 5' RNA decay in the *topA* null mutant, as opposed to the normal 5' to 3' pathway initiated by the binding of RNase E to the 5' end of mRNAs (18), would be compatible with RNase HI, not RNase E, initiating RNA decay in *topA* null cells after temperature downshifts.

Therefore, according to our model, R-loops inhibit normal RNA processing as RNase E do not have access to RNA in RNA-DNA hybrids. However, such R-loops are targets for RNase HI thus leading to RNA degradation. When there is no hypernegatively supercoiled DNA (at 37 °C or when RNase HI is sufficiently overproduced) extensive R-loop formation is prevented and there is no significant RNA degradation. This explains why the RNA pattern in *topA*⁻ cells overproducing RNase HI is normal. The level of RNase HI activity required to efficiently inhibit gyrase-mediated hypernegative supercoiling is much higher than the level required to degrade the RNA in R-loops, because RNase HI must compete with the strong supercoiling activity of gyrase following downshifts. RNase HI activity becomes toxic only in the presence of hypernegatively supercoiled DNA, because it then leads to extensive RNA degradation. In *topA*⁺ cells, where the supercoiling level is normal, the wild-type level of RNase HI activity is sufficient to rapidly eliminate the few R-loops that form during transcription.

A more direct test of RNase HI involvement in RNA degradation in *topA* mutants would involve inactivating the *rnhA* gene: deleting *rnhA* should allow the accumulation of full-length functional RNAs, and it should correct the growth problems of *topA* mutants at non-permissive temperatures. Although double *topA rnhA* null mutants cannot be constructed (11, 30), we have shown that depletion of RNase HI activity in *topA* null cells eventually leads to extensive DNA relaxation, segregation defects, and growth inhibition (44). Extensive DNA relaxation was related to a cellular response leading to gyrase inhibition, possibly to protect cells from the deleterious effect of R-loop-dependent hypernegative supercoiling by gyrase. We found that *topA* null mutants depleted in RNase HI activity accumulated normal full-length RNAs following temperature downshifts (Sanscartier *et al.*, unpublished observation). Segregation problems leading to growth inhibition were likely due to replication defects related to the lack of RNase HI activity (44).

Although our data are compatible with a direct involvement of RNase HI in RNA degradation in *topA* mutants, we cannot exclude the contribution of a yet unknown mechanism triggered by hypernegative supercoiling. Such a mechanism, however, must be consistent with the finding that *de novo* protein synthesis is not required for RNA degradation following temperature downshifts. As stated in the Results section, several of the phenotypes seen for the *topA* null mutants following temperature downshifts are reminiscent to toxin-antitoxin (TA) systems such as MazEF (50) or ChpBIK (51). In these systems, the stable toxin (an endoribonuclease) is produced from a polycistronic RNA that also encodes the unstable antitoxin. Conditions that inhibit the expression of the polycistronic RNA, such as the addition of protein synthesis inhibitors including spectinomycin, lead to the rapid elimination of the antitoxin, thus allowing the endoribonuclease to degrade RNA. However, our observation that the RNA degradation phenotype of *topA* null cells exposed to spectinomycin at 37 °C is still only observed when such cells are transferred to 28 °C (2 and Baaklini and Drolet, unpublished results) is not easily explained by the induction of a TA system.

Transcription arrest may also be a mechanism by which R-loops inhibit gene expression (2, 9, 14). With yeast, such a mechanism has been proposed (16) and recently supported by the results of *in vitro* experiments (43). With *E. coli*, pulse-labelling experiments showed that the rate of rRNA synthesis is reduced in *topA* null *gyrB*(Ts) cells not overproducing RNase HI at the non-permissive temperature (14). Therefore, in *E. coli*, R-loops could act as roadblocks for RNA polymerases transcribing highly expressed genes, such as those encoding rRNA (*rrn* operons).

Recovery of growth. The transient growth inhibition shown in Fig. 1 is also observed with partially defective topoisomerase I: strain RS2 (41), when shifted from 37 °C to 17 °C, undergoes a 7-hr growth lag (K. Drlica, unpublished observation). This lag is alleviated by a compensatory *gyrB* mutation (strain SD7, ref. 7), which suggests that gradual reduction of gyrase activity may restore growth in *topA* mutants. It will now be interesting to determine whether the cellular response leading to gyrase inhibition when RNase HI activity is depleted in *topA* mutants (44) contributes to the recovery of growth at low temperature.

Acknowledgments

This work was supported by grant FNR 12667 from the CIHR to M.D and NIH grants AI35257, AI63431, and AI73491 to K.D. M.D. was a Chercheur-Boursier Senior from the FRSQ.

We thank A.J Carpousis for the strain carrying the *rne114* mutation and Robert Crouch for the RNase HI used in the *in vitro* transcription experiments. We also thank Patrick Hallenbeck for editing of the manuscript.

References

1. Adhya, S., and M. Gottesman. 1978. Control of transcription termination. *Annu. Rev. Biochem.* **47**:967-996.
2. Baaklini, I., C. Hraiky, F. Rallu, Y.-C. Tse-Dinh, and M. Drolet. 2004. RNase HI is required for efficient full-length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **54**:198-211.
3. Ball, C. A., R. Osuna, K. C. Ferguson, K., and R. C. Johnson. 1992. Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:8043-8056.
4. Broccoli, S., F. Rallu, P. Sanscartier, S. M. Cerritelli, R. J. Crouch, and M. Drolet. 2004. Effects of RNA polymerase modifications on transcription-induced supercoiling and associated R-loop formation. *Mol. Microbiol.* **52** :1769-1779.
5. Condon, C., C. Squires and C. L. Squires. 1995. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **59**:623-645.
6. Daniels, G. A., and M. Lieber. 1995. RNA:DNA complex formation upon transcription of immunoglobulin switch regions: implications for the mechanism and regulation of class switch recombination. *Nucleic Acids Res.* **23**:5006-5011.
7. DiNardo, S., K. A. Voelkel, R. Sternglanz, A. E. Reynolds, and A. Wright. 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* **31**:43-51.
8. Drlica, K., and M. Snyder. 1978. Superhelical *Escherichia coli* DNA: relaxation by coumermycin. *J. Mol. Biol.* **120**:145-154.
9. Drolet, M. 2006. Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol. Microbiol.* **59**:723-730.
10. Drolet, M., X. Bi, and L. F. Liu. 1994. Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **269**:2068-2074.
11. Drolet, M., P. Phoenix, R. Menzel, E. Massé, L. F. Liu, and R. J. Crouch. 1995. Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:3526-3530.

12. Gellert, M., K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, and H. A. Nash. 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*. **73**:3872-3876.
13. Gellert, M., M. H. O'Dea, T. Itoh, and J. Tomizawa. 1976. Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:4474-4478.
14. Hraiky, C., M. A. Raymond, and M. Drolet. 2000. RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**:11257-11263.
15. Huang, F. T., K. Yu, C. L. Hsieh, and M. R. Lieber. 2006. Downstream boundary of chromosomal R-loops at murine switch regions: implications for the mechanism of class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:5030-5035.
16. Huertas, P., and A. Aguilera. 2003. Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol. Cell* **12**:711-721.
17. Iost, I., and M. Dreyfus. 1995. The stability of *Escherichia coli lacZ* mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO J.* **14**:3252-3261.
18. Kushner, S. R. 2005. mRNA decay and processing. p. 327-345. *In* N. P. Higgins. (ed.), *The Bacterial Chromosome*. ASM Press, Washington, DC.
19. Leroy, A., N. F. Vanzo, S. Sousa, M. Dreyfus, and A. J. Carpousis. 2002. Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol. Microbiol.* **45**:1231-1243.
20. Lewicki, B. T., T. Margus, J. Remme, and K. H. Nierhaus. 1993. Coupling of rRNA transcription and ribosomal assembly *in vivo*. Formation of active ribosomal subunits in *Escherichia coli* requires transcription of rRNA genes by host RNA polymerase which cannot be replaced by bacteriophage T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **231**:581-593.
21. Li, Y., and S. Altman. 2004. Polarity effects in the lactose operon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **339**:31-39.
22. Liu, L. F., and J. C. Wang. 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:7024-7027.
23. Lodge, J. K., T. Kazic, and D. E. Berg. 1989. Formation of supercoiling domains in plasmid pBR322. *J. Bacteriol.* **171**:2181-2187.

24. Lopez P.J., I. Marchand, O. Yarchuk and M. Dreyfus. 1998. Translation inhibitors stabilize *Escherichia coli* mRNAs independently of ribosome protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6067-6072.
25. Lynch, A. S., and J. C. Wang. 1993. Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *J. Bacteriol.* **175**:1645-1655.
26. Mackie, G. A. 1998. Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* **395**:720-723.
27. Mackie, G. A. Donly, B. C. And Wong, P. C. (1990) In Spedding, G. (ed.), *Ribosomes and Protein Synthesis: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, UK.
28. Massé, E., and M. Drolet. 1999. Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **274**:16654-16658.
29. Massé, E., and M. Drolet. 1999. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J. Biol. Chem.* **274**:16659-16664.
30. Massé, E., and M. Drolet. 1999. R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli topA* mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J. Mol. Biol.* **294**:321-332.
31. Massé, E., P. Phoenix, and M. Drolet. 1997. DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**:12816-12823.
32. Miller, J. H. 1992. *A short Course in Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
33. Phoenix, P., M. A. Raymond, E. Massé, and M. Drolet. 1997. Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **272**:1473-1479.
34. Powell, B. S., M. P. Rivas, D. L. Court, Y. Nakamura and C. L. Jr. Turnbough. 1994. Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic Acids Res.* **23**:1278.

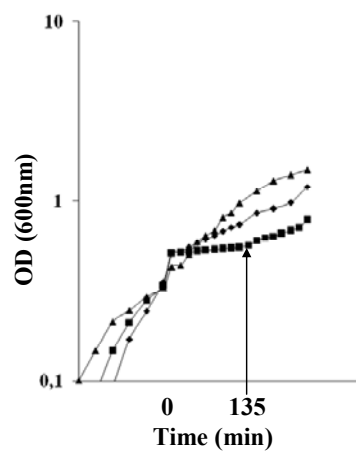
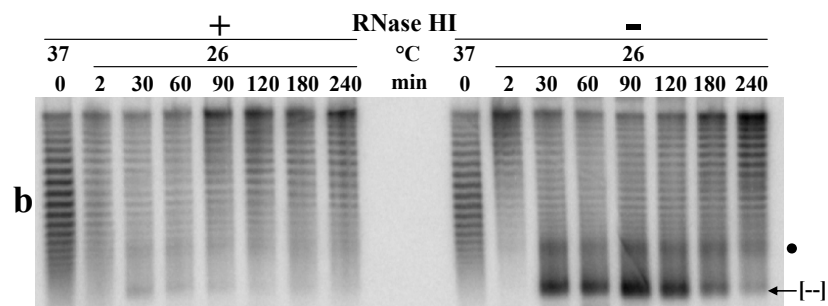
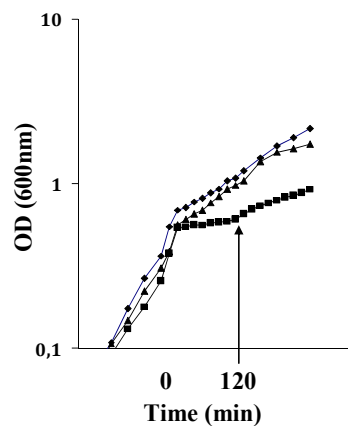
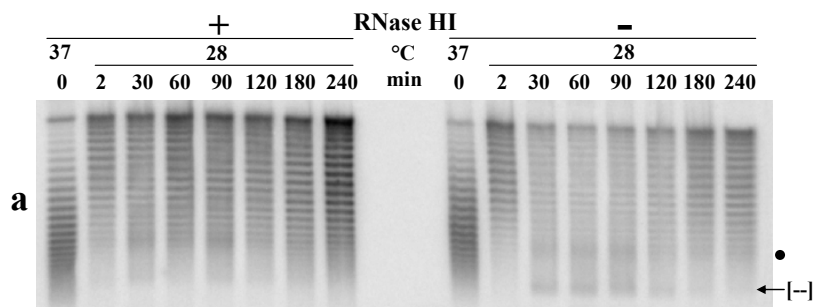
35. Pruss, G. J. 1985. DNA topoisomerase I mutants. Increased heterogeneity in linking number and other replicon-dependent changes in DNA supercoiling. *J. Mol. Biol.* **185**:51-63.
36. Pruss, G. J., and K. Drlica. 1986. Topoisomerase I mutants: the gene on pBR322 that encodes resistance to tetracycline affects plasmid DNA supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:8952-8956.
37. Pruss, G. J., S. H. Manes, and K. Drlica. 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* **31**:35-42.
38. Samul, R., and F. Leng. 2007. Transcription-coupled hypernegative supercoiling of plasmid DNA by T7 RNA polymerase in *Escherichia coli* topoisomerase I-deficient strains. *J. Mol. Biol.* **374**:925-935.
39. Simons, R. W., F. Houman, and N. Kleckner. 1987. Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**:85-96.
40. Spirito, F., and L. Bossi. 1996. Long-distance effect of downstream transcription on activity of the supercoiling-sensitive *leu-500* promoter in a *topA* mutant of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **178**:7129-7137.
41. Sternglanz, R. S. DiNardo, K. A. Voelkel, Y. Nishimura, Y. Hirota, K. Becherer, L. Zumstein, and J. C. Wang. 1981. Mutations in the gene coding for *Escherichia coli* DNA topoisomerase I affect transcription and transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:2747-2751.
42. Stupina, V. A., and J. C. Wang. 2005. Viability of *Escherichia coli topA* mutants lacking DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **280**:355-360.
43. Tous, C., and A. Aguilera. 2007. Impairment of transcription elongation by R-loops *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**:428-432.
44. Usongo V., F. Nolent, P. Sanscartier, C. Tanguay, S. Broccoli, I. Baaklini, K. Drlica and M. Drolet. 2008. Depletion of RNase HI activity in *Escherichia coli* lacking DNA topoisomerase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation. *Mol. Microbiol.* [Epub ahead of print] doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06334.x.
45. Wei, Y., J. M. Lee, C. Richmond, F. R. Blattner, J. A. Rafalski, and R. A. LaRossa. 2001. High-density microarray-mediated gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:545-556.

46. Yarchuk, O., N. Jacques, J. Guillerez, and M. Dreyfus. 1992. Interdependence of translation, transcription and mRNA degradation in the *lacZ* gene. *J. Mol. Biol.* **226**:581-596.
47. Yu, K., F. Chedin, C. L. Hsieh, T. E. Wilson, and M. R. Lieber. 2003. R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat. Immunol.* **4**:442-451.
48. Yu, K., D. Roy, M. Bayramyan, I. S. Haworth and M. R. Lieber. 2005. Fine-structure analysis of activation-induced deaminase accessibility to class switch region R-loops. *Mol. Cell. Biol.* **25**:1730-1736.
49. Zechiedrich, E. L., A. B. Khodursky, S. Bachellier, R. Schneider, D. Chen, D. M. Lilley, and N. R. Cozzarelli. 2000. Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**:8103-8113.
50. Zhang Y., J. Zhang, K. P. Hoefflich, M. Ikura, G. Qing, and M. Inouye. 2003. MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* **12**:913-923.
51. Zhang Y., L. Zhu, J. Zhang, and M. Inouye. 2005. Characterization of ChpBK, an mRNA interferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**:26080-26088.

Table 1. *Escherichia coli* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source or Ref.
MA249	<i>ilv metB his-29 trpA9605 pro thyA deoB</i> (or <i>C</i>) <i>gyrB221(cou^R) gyrB203(Ts) zie-3163::Tn10kan</i>	14
MA251	<i>ilv metB his-29 trpA9605 pro thyA deoB</i> (or <i>C</i>) <i>gyrB221(cou^R) gyrB203(Ts) zie-3163::Tn10kan</i> <i>topA20::Tn10</i>	14
IB34	MA251 pSK760	This work
RFM445	<i>rpsL galK2 gyrB221(cou^R) gyrB203(Ts) Δlac74</i>	11
RFM475	<i>rpsL galK2 gyrB221(cou^R) gyrB203(Ts) Δ(topA cysB)204 Δlac74</i>	11
VU4	RFM475 pMD306	This work
VU7	VU4 pEM001	This work
VU8	VU4 pEM003	This work
PS63	RFM475 $\phi(lacI^q\text{-}P_{trc}\text{-}lac)$	This work
PS64	RFM445 $\phi(lacI^q\text{-}P_{trc}\text{-}lac)$	This work
PS66	PS63 pEM001	This work
PS68	PS63 pEM003	This work
PS70	PS64 pEM001	This work
PS72	PS64 pEM003	This work
PS123	PS63 <i>rneΔ14</i>	This work

PS126PS64 *rne* Δ 14This work



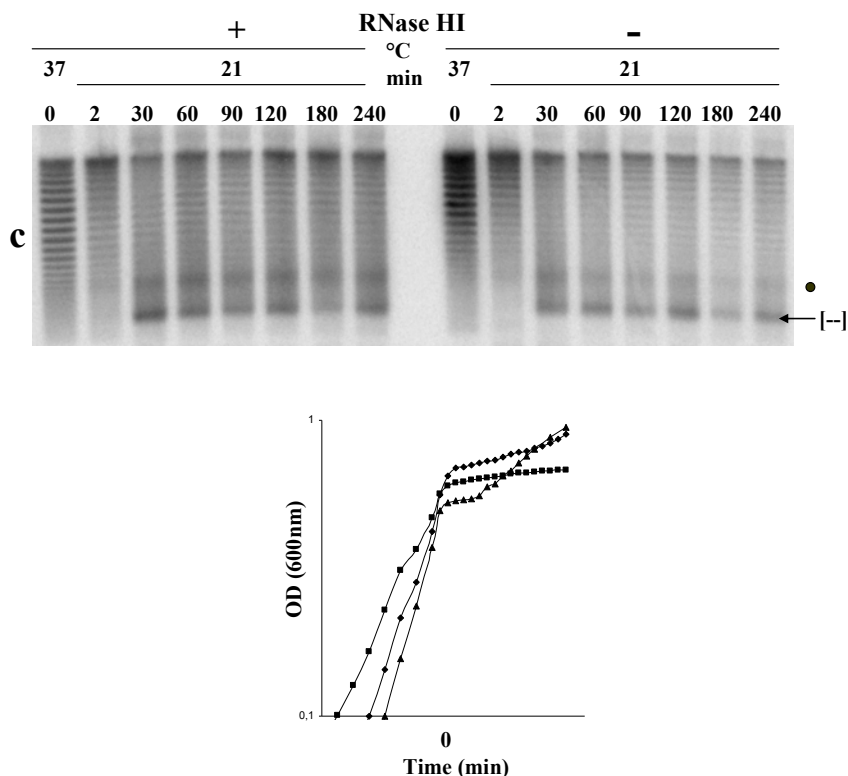


Figure 1. Correlation between hypernegative supercoiling and growth inhibition after temperature downshifts. Cells were grown at 37 °C to log phase as indicated in Materials and Methods before being transferred to 28 °C (a), 26 °C (b) or 21 °C (c). Plasmid DNA from the *topA* null strains was extracted just before the temperature downshift (time 0) and at the indicated times after the downshift. DNA was loaded on an agarose gel with 7.5 µg/ml of chloroquine and probed to reveal hypernegatively supercoiled pMD306 (top panels). Note that at this chloroquine concentration, the more relaxed topoisomers migrate faster, except hypernegatively supercoiled DNA, which also migrates rapidly (indicated by [--]). The dot points to a signal reflecting a negative supercoiling-dependent structural transition that was previously observed for this plasmid following 2-D gel analysis (4, 31). On the top of the gels, + and – respectively indicate that RNase HI was overproduced (pEM001) or not overproduced (pEM003). The arrow on the growth curves (bottom) indicates the time when growth resumed following the downshifts. VU7 (*gyrB*(Ts) *topA*/pMD306 and pEM001), ◆; VU8 (*gyrB*(Ts) *topA*/pMD306 and pEM003), ■; RFM445 (*gyrB*(Ts)), ▲.

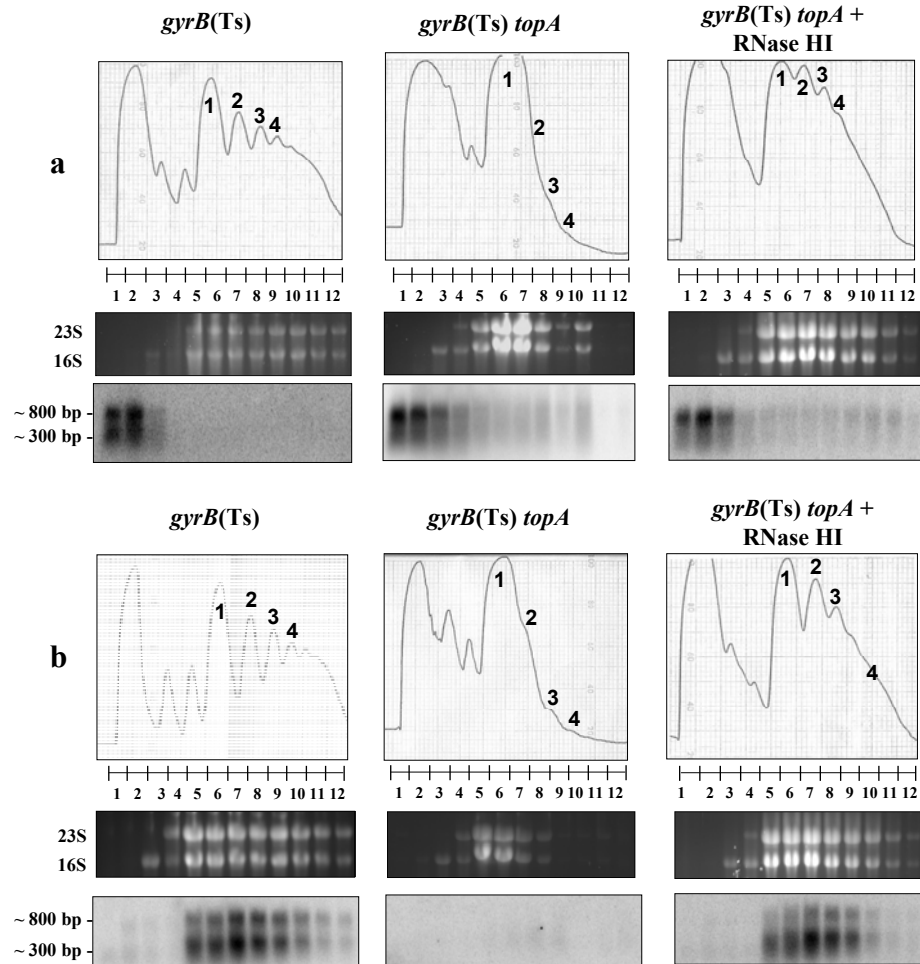


Figure 2. Association of *yhdG* and *fis* mRNAs with ribosomes after a temperature downshift. Cells were grown at 37 °C to log phase as indicated in Materials and Methods before being transferred to 28 °C. After 20 minutes, cells were recovered for sucrose gradient fractionation of ribosomes and mRNA analysis as described in Materials and Methods. Top panels show the ribosome profiles (A_{260}) with the numbers pointing to the peaks corresponding to monosomes (1, one ribosome per RNA) and to polysomes (2, 3, 4; two or more ribosomes per RNA). The numbers below the ribosome profiles correspond to the different fractions from which the RNA was extracted. The middle panels show the ethidium bromide stained gels with 23S and 16S rRNA. These gels were used for Northern blot analysis as described in Materials and Methods with probes corresponding to *yhdG* (a) or to *fis* (b). The strains used are MA249 (*gyrB(Ts)*), MA251 (*gyrB(Ts) topA*) and IB34 (*gyrB(Ts) topA/pSK760*). + RNase HI indicates that RNase HI was overproduced (pSK760).

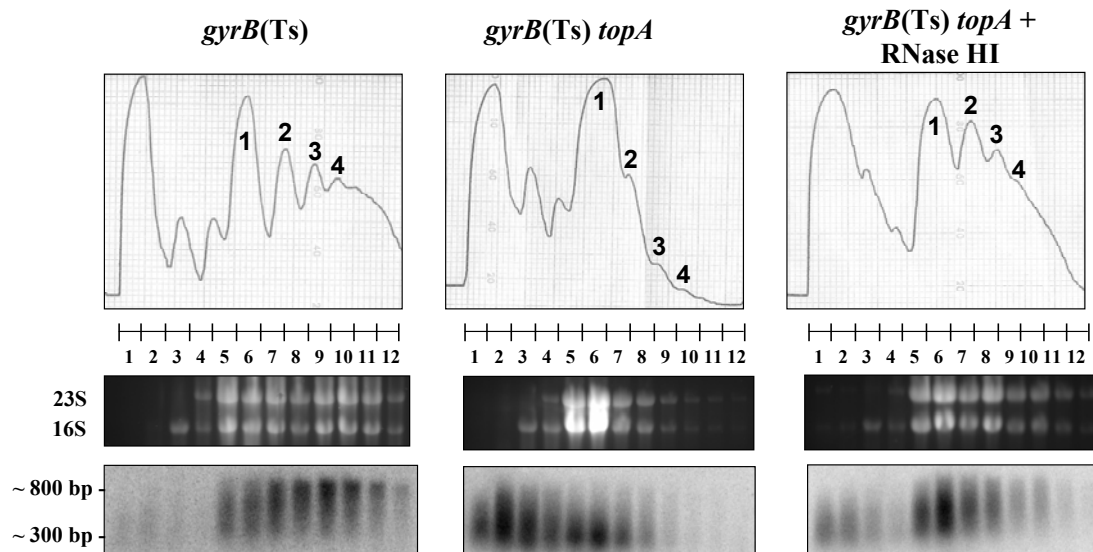


Figure 3. Association of *crp* mRNAs with ribosomes after a temperature downshift. Cells were grown and recovered for sucrose gradient fractionation of ribosomes and mRNA analysis as described in the legend to Figure 2. Top, middle and bottom panels are as described in the legend to Figure 2. The probe used for the Northern blot analysis corresponds to *crp*.

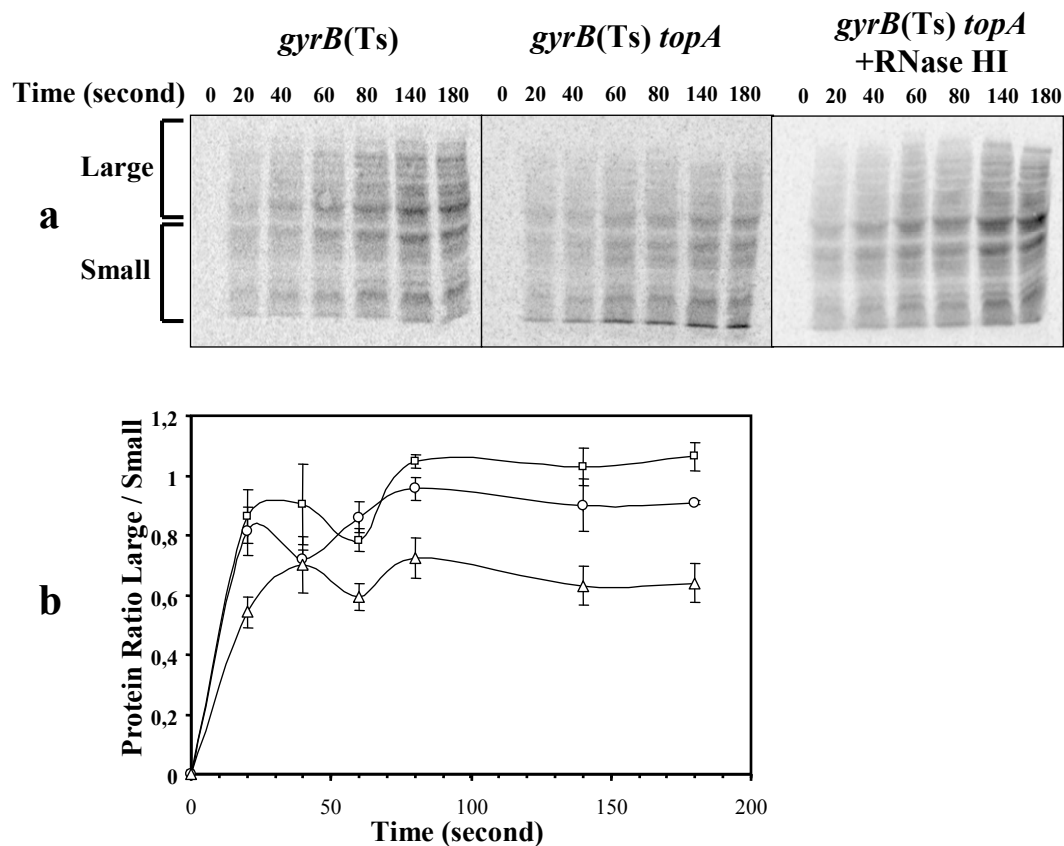


Figure 4. Protein synthesis after a temperature downshift. Cells were grown at 37 °C to log phase before being transferred to 28 °C. After 20 minutes, L-[³⁵S]cysteine was added and aliquots were recovered at different times to follow protein synthesis as described in Materials and Methods. Samples were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis as described in Materials and Methods. Shown in (a) is the result of one experiment. The two area delimited by the brackets respectively labelled large and small were chosen to calculate the large/small ratios graphically represented in (b) (three independent experiments). MA249 (*gyrB(Ts)*), □; MA251 (*gyrB(Ts) topA*), Δ; IB34 (*gyrB(Ts) topA/pSK760*), ○.

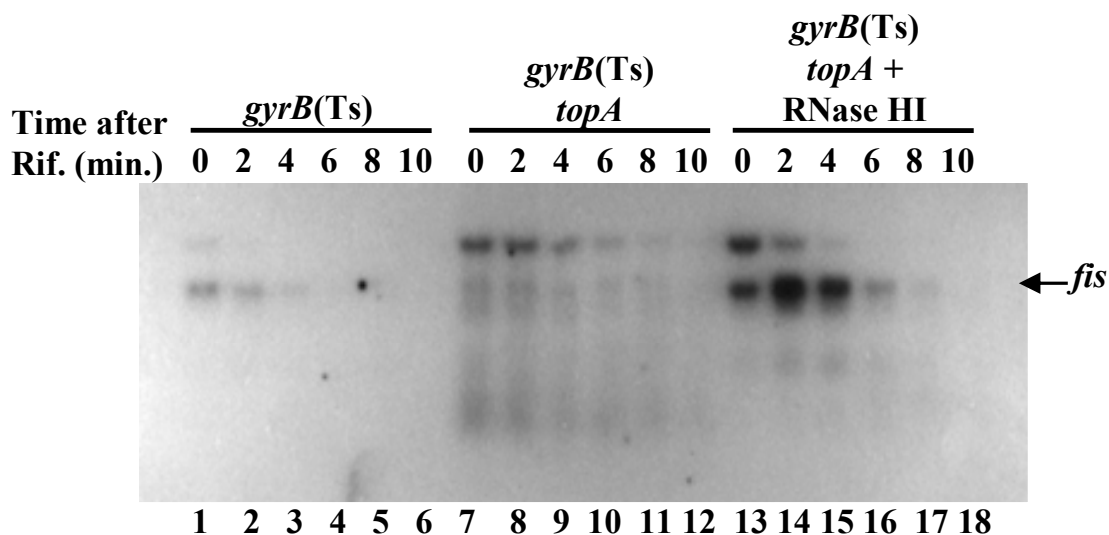


Figure 5. Expression and processing of *fis* mRNAs after a temperature downshift. Cells were grown at 37 °C to log phase as indicated in Materials and Methods before being transferred to 28 °C. After 20 minutes, rifampicin at 250 µg/ml (final concentration) was added to the cells, and the RNA was extracted at the indicated time (for time 0 the RNA was extracted immediately before the addition of rifampicin). Ten µg of RNA samples were used for Northern blot analysis with an oligonucleotide probe hybridizing to *fis* as described in Materials and Methods. The strains used are MA249 (*gyrB*(Ts)), MA251 (*gyrB*(Ts) *topA*) and IB34 (*gyrB*(Ts) *topA*/pSK760). + RNase HI indicates that RNase HI was overproduced (pSK760).

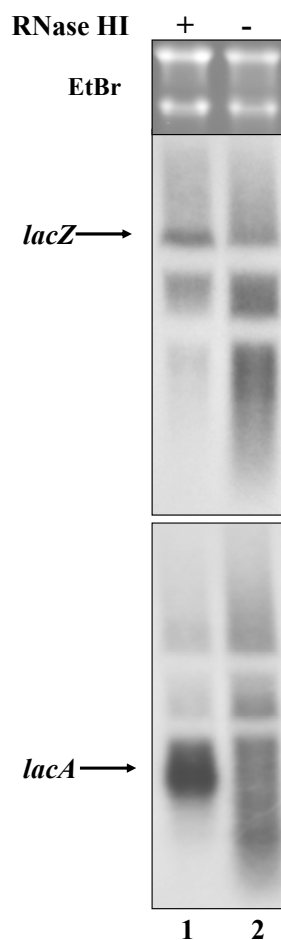


Figure 6. Expression and processing of *lac* mRNAs after a temperature downshift. Cells were grown at 37 °C to log phase as indicated in Materials and Methods before being transferred to 28 °C. Five minutes following this transfer, IPTG was added to 1 mM to induce *lac* expression from the chromosomal *P_{trc}-lac* fusion, and 30 minutes later aliquots of the cell cultures were taken for RNA extraction. The strains used are PS66 (*gyrB*(Ts) *topA* Δ (*lacI*^q-*P_{trc}-lac*)/pEM001) and PS68 (*gyrB*(Ts) *topA* Δ (*lacI*^q-*P_{trc}-lac*)/pEM003). + and – respectively indicate that RNase HI was overproduced (pEM001) or not overproduced (pEM003). Fifteen μ g of RNA were used for Northern blot analysis with random prime-labelled probes hybridizing to *lacZ* (top panel) or *lacA* (bottom panel) as described in Materials and Methods.

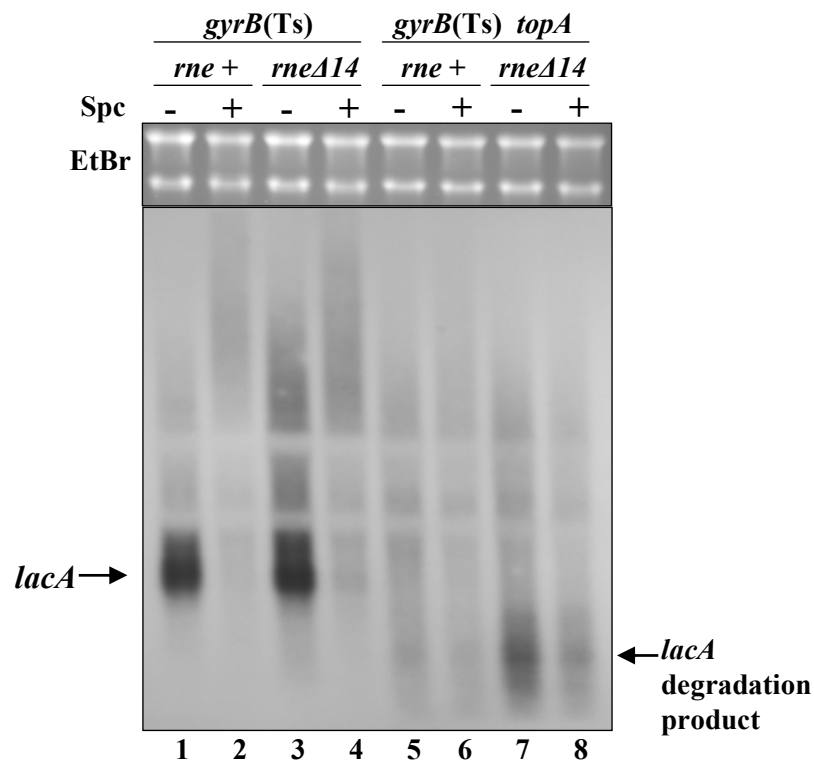


Figure 7. The effects of *rneΔ14* and spectinomycin on the processing of *lacA* mRNAs after a temperature downshift. Cells were grown at 37 °C to log phase as indicated in Materials and Methods. Spectinomycin (final concentration, 400 μg/ml) was added to one-half of the culture and 5 minutes later the cells were transferred to 28 °C. Five minutes following this transfer, IPTG was added to 1 mM to induce *lac* expression from the chromosomal *P_{trc}-lac* fusion, and 30 minutes later aliquots of the cell cultures were taken for RNA extraction. The strains used are PS63 (*gyrB*(Ts) *topA* Δ(*lacI^q*-*P_{trc}-lac*), PS64 (*gyrB*(Ts) Δ(*lacI^q*-*P_{trc}-lac*), PS123 (*gyrB*(Ts) *topA* Δ(*lacI^q*-*P_{trc}-lac* *rneΔ14*) and PS126 (*gyrB*(Ts) Δ(*lacI^q*-*P_{trc}-lac* *rneΔ14*). Spc is spectinomycin.

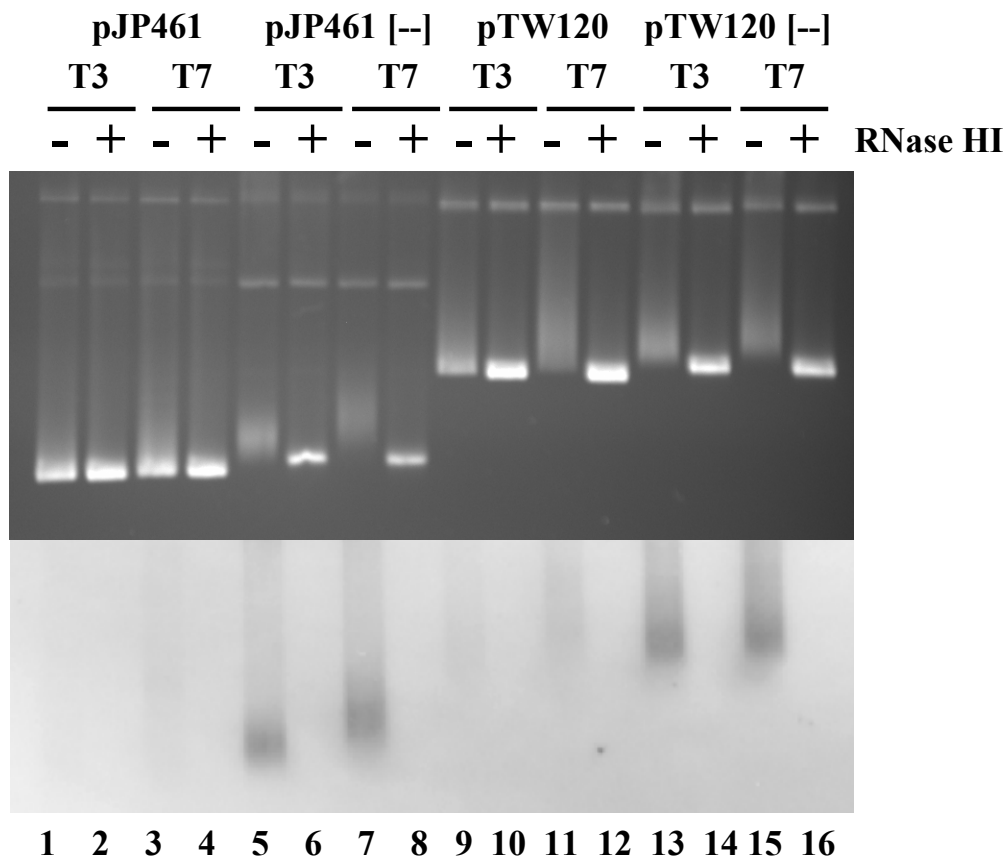


Figure 8. R-loop formation on hypernegatively supercoiled templates *in vitro*. *In vitro* transcription reactions were performed as described in Materials and Methods in the presence of both $^{[32P]}$ -UTP and $^{[32P]}$ -ATP. Samples were loaded on an agarose gel without chloroquine. The bottom panel is the autoradiography of the gel to reveal RNA in R-loops. [--] indicates hypernegatively supercoiled templates.

**Depletion of RNase HI activity in Escherichia coli lacking DNA
topoisomerase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation**

Valentine Usongo¹, Flora Nolent¹, Patrick Sanscartier¹, Cynthia Tanguay¹, Sonia Broccoli¹, Imad Baaklini¹, Karl Drlica² and Marc Drolet^{1, 3}. (2008) *Molecular Microbiology*, **69** (4), 968-98.

¹ Département de microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, C. P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, P. Québec, Canada, H3C 3J7

² Public Health Research Institute, Newark, NJ

³ Corresponding author

Phone : (514) 343-5796

FAX : (514) 343-5701

Running title : RNase HI in DNA topologie

Key words : *topA*, topoisomerase I, gyrase, RNase HI, segregation

Contributions

Pour les études menées dans cet article, j'ai tout d'abord réalisé l'expérience *in vivo* présentée à la figure 2 où l'on peut observer le surenroulement de l'ADN dans les doubles mutants *topA rnhA* après inhibition de la transcription via l'ajout de rifampicine. De plus, j'ai réalisé des northern blot de *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* et *topB* qui supportent l'expérience du Western blot présenté à la figure 3. J'ai également validé l'expérience d'inhibition de la topoisomérase IV via l'ajout de norfloxacine en déterminant les conditions expérimentales adéquates. En outre, j'ai été le premier membre de l'équipe à mettre au point les dosages *in vitro* de l'activité de la gyrase présentés à la figure 7. J'ai finalement confirmé la majorité des résultats présentés dans cet article.

Résumé

Chez *Escherichia coli*, l'hypersurenroulement négatif est une des manifestations de la formation de R-loop, un phénomène qui est normalement supprimé par la topoisomérase I (*topA*). La surexpression de la RNase HI (*rnhA*), une enzyme qui dégrade l'ARN impliqué dans les R-loops, prévient l'hypersurenroulement négatif et permet la croissance des mutants *topA*⁻. Nous avons montré auparavant que les mutations *topA*⁻ et *rnhA*⁻ étaient incompatibles. Nous démontrons maintenant que certains de ces mutants étaient viables lorsque la RNase HI ou la topoisomérase III étaient exprimées à partir d'un plasmide. Étonnement, en absence de RNase HI, l'ADN des mutants *topA*⁻ devenait relaxé au lieu d'être hypersurenroulé négativement. Ce résultat ne corrèle pas avec la concentration intracellulaire de gyrase ou de topoisomérase IV (l'autre enzyme capable de relaxer) ou avec le surenroulement induit par la transcription. La relaxation de l'ADN en absence de RNase HI était directement liée à l'inhibition de l'activité de la gyrase à la fois *in vivo* et *in vitro*. Les cellules *topA*⁻ et *rnhA*⁻ présentent également des propriétés menant à des défauts de ségrégation. La surexpression de la topoisomérase III, une enzyme capable de faire les réactions de décaténation, corrigeait ces défauts de ségrégation sans restaurer le surenroulement. En somme, ces résultats révèlent tout d'abord l'existence d'une réponse cellulaire à la perte de RNase HI inhibant l'activité de surenroulement de la gyrase et enfin, un défaut de ségrégation indépendant du surenroulement dû à l'absence de RNase HI dans les mutants *topA*⁻. Finalement, contrairement à ce qui avait été supposé auparavant, la RNase HI joue un rôle central dans la topologie de l'ADN.

Abstract

Gyrase-mediated hypernegative supercoiling is one manifestation of R-loop formation, a phenomenon that is normally suppressed by topoisomerase I (*topA*) in *Escherichia coli*. Overproduction of RNase HI (*rnhA*), an enzyme that removes the RNA moiety of R-loops, prevents hypernegative supercoiling and allows growth of *topA* null mutants. We previously showed that *topA* and *rnhA* null mutations are incompatible. We now report that such mutants were viable when RNase HI or topoisomerase III was expressed from a plasmid-borne gene. Surprisingly, DNA of *topA* null mutants became relaxed rather than hypernegatively supercoiled following depletion of RNase HI activity. This result failed to correlate with the cellular concentration of gyrase or topoisomerase IV (the other relaxing enzyme in the cell) or with transcription-induced supercoiling. Rather, intracellular DNA relaxation in the absence of RNase HI was related to inhibition of gyrase activity both *in vivo* and in extracts. Cells lacking *topA* and *rnhA* also exhibited properties consistent with segregation defects. Overproduction of topoisomerase III, an enzyme that can carry out DNA decatenation, corrected the segregation defects without restoring supercoiling activity. Collectively these data reveal 1) the existence of a cellular response to loss of RNase HI that counters the supercoiling activity of gyrase and 2) supercoiling-independent segregation defects due to loss of RNase HI from *topA* null mutants. Thus RNase HI plays a more central role in DNA topology than previously thought.

Introduction

Negative DNA supercoiling is a regulated feature of bacterial chromosomes (Menzel and Gellert, 1983; DiNardo *et al.*, 1982; Pruss *et al.*, 1982; Drlica, 1992) that is important for most processes involving DNA strand separation. In *E. coli*, supercoiling regulation is achieved largely by DNA topoisomerases with opposing enzymatic activities. DNA gyrase, encoded by *gyrA* and *gyrB*, introduces negative supercoils, while two other enzymes, DNA topoisomerase I (*topA*) and DNA topoisomerase IV (*parC* and *parE*), remove excess negative supercoils (Pruss *et al.*, 1982; Zechiedrich *et al.*, 2000). Although the ability to create *topA* null mutants is a clear indication that topoisomerase I is not required for survival (Sternglanz *et al.*, 1981; Stupina and Wang, 2005), growth of such mutants often requires compensatory mutations that reduce negative supercoiling (DiNardo *et al.*, 1982; Pruss *et al.*, 1982). Indeed, very high levels of supercoiling (hypernegative supercoiling, detected as plasmid topoisomers that cannot be resolved by electrophoresis in agarose gels (Pruss, 1985) can accumulate in *topA* null mutants (Pruss, 1985) and correlate with growth inhibition (Massé and Drolet, 1999a,b).

One major pathway for generating hypernegative supercoiling in *topA* mutants involves R-loop formation coupled to gyrase activity (Massé and Drolet, 1999c). Hypernegative supercoiling is initiated by the accumulation of negative supercoils behind moving RNA polymerase when topoisomerase I is absent (Massé and Drolet, 1999c). These negative supercoils promote re-hybridization of nascent transcripts to the template DNA strand, which leaves the non-template strand unpaired and the DNA relaxed. Relaxed DNA is a substrate for gyrase, which then introduces more supercoils that lead to increased R-loop formation, more DNA relaxation, and increased gyrase action (Drolet *et al.*, 1994; Phoenix *et al.*, 1997; Drolet, 2006). Removal of RNA-DNA hybrids by overproduction of RNase HI suppresses the accumulation of hypernegative supercoils and the associated growth defect (Drolet *et al.*, 1995; Massé and Drolet, 1999c). Growth inhibition and hypernegative supercoiling also correlate with major gene expression defects, as illustrated by the accumulation of truncated RNAs (Baaklini *et al.*, 2004; Baaklini *et al.*, manuscript submitted). Within this context, our inability to construct double *topA rnhA* null mutants did not come as a surprise (Massé and Drolet, 1999b;

Drolet *et al.*, 1995). Indeed, it was predicted that such double mutants would die from toxic levels of hypernegative supercoiling.

In the present work, we constructed *topA rnhA* double mutants that grew when *rnhA* was expressed from a plasmid-borne gene. Unexpectedly, we found that under non-permissive conditions the DNA of such mutants was relaxed, not hypernegatively supercoiled. Depletion of RNase HI activity in *topA* null mutants triggered a cellular response that inhibited supercoiling by gyrase. Moreover, the growth inhibition of *topA rnhA* null double mutants correlated with phenotypes reminiscent of segregation defects: extensive cell filamentation with abnormal nucleoid structures and accumulation of anucleate cells. Overproduction of topoisomerase III (*topB*), a type IA enzyme like topoisomerase I, corrected the segregation defects and allowed *topA rnhA* double mutants to grow without restoring supercoiling. Such activity was consistent with topoisomerase III being able to decatenate daughter DNA molecules (Hiasa *et al.*, 1994) and use R-loops as a substrate (Broccoli *et al.*, 2000). Thus high-level expression of a plasmid-borne *topB* gene provided a second way to allow conditional growth of *topA rnhA* double mutants. Below we describe measurements of bacterial DNA supercoiling and cell morphology that reveal an important role for RNase HI in preventing transcription from perturbing DNA topology beyond viable bounds.

Results

Absence of RNase HI prevents accumulation of hypernegative supercoiling associated with a *topA* deficiency.

We previously described the effects of topoisomerase I defects in living cells using a set of *E. coli* strains in which a temperature-sensitive gyrase mutation allows the growth of *topA* null cells at 37°C but not at 28°C owing to reactivation of gyrase (Drolet *et al.*, 1995). In such strains hypernegatively supercoiled DNA accumulates following the temperature downshift unless RNase HI is overproduced (Massé and Drolet, 1999c). Overproduction of RNase HI at 28°C also restores growth. To better understand relationships among hypernegative supercoiling, R-loops, and growth inhibition, we constructed a conditional *topA rnhA* double mutant (transduction was used to introduce an *rnhA::cam* allele into a *topA20::Tn10 gyrB(Ts)* strain carrying a plasmid expressing *rnhA* under control of the arabinose-inducible P_{BAD} promoter). Transductants were obtained by plating at 37°C in the presence but not in the absence of arabinose (not shown). When these transductants were transferred to liquid medium lacking arabinose, cells grew slowly, cell filamentation occurred, and culture growth stopped prematurely, irrespective of temperature (not shown). Thus, when RNase HI is absent, the growth defects of *topA* null *gyrB(Ts)* mutants were seen even at 37°C. Since colonies arose after plating on solid medium containing arabinose, we conclude that deleting *rnhA* in *topA* mutants is bacteriostatic, not bactericidal (not shown).

Supercoiling was measured with plasmid pGB2*nusB::kan*, a low copy-number derivative of pSC101 that is prone to R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *topA* null mutants (Broccoli *et al.*, 2004). Plasmid topoisomers were resolved using agarose gel electrophoresis in the presence of 7.5 µg/ml of chloroquine, as previously described (Massé and Drolet, 1999c). Under this condition the more relaxed topoisomers migrated faster; hypernegatively supercoiled DNA also migrated rapidly. With a *gyrB(Ts)* control strain lacking only *topA* (strain PS152), hypernegatively supercoiled DNA accumulated after transfer of cells from 37 to 28°C (Fig. 1a, lane 2, indicated by [---]). When an *rnhA* null mutation was added (strain PS151, which also carried an inducible *rnhA* gene), and mutant cells from arabinose-containing agar were incubated overnight at 37°C in the absence of arabinose, followed by 1:1000 dilution into medium lacking

arabinose, cell growth was sufficient for examination of plasmid supercoiling. A portion of the DNA was more relaxed at 37°C than in *topA* single mutant cells (Fig. 1a, compare lanes 1 and 3), and hypernegatively supercoiled DNA failed to accumulate following a transfer to 28°C (Fig. 1a, lane 4). The relaxed portion of topoisomers remained extensively relaxed following the temperature downshift (Fig. 1a, lanes 3 and 4, indicated by [rel]). These extensively relaxed topoisomers were not observed in wild-type (lanes 5 and 6) or in *gyrB*(Ts) (lanes 7 and 8) cells. Thus, removal of *rnhA* from a *topA*-deficient strain caused DNA relaxation and loss of hypernegative supercoiling.

When arabinose was added to the diluted (1:1000) overnight culture of the *topA rnhA* double mutant (strain PS151) to produce RNase HI from a plasmid-borne gene, supercoiling was restored at 37°C (Fig. 1a, compare lane 3, no arabinose, with lane 9, 0.05% arabinose) and accumulation of hypernegatively supercoiled DNA occurred following a temperature downshift (Fig. 1a, lane 10). Since RNase HI was overproduced in this experiment, *topA* null cells accumulated lower amounts of hypernegatively supercoiled DNA than observed with *topA* null cells having only wild-type levels of RNase HI (Fig. 1a, compare lanes 2, *topA* null cells, and 10, *topA rnhA* double mutant with 0.05% arabinose).

Two-dimensional gel electrophoresis confirmed the presence of hypernegatively supercoiled and extensively relaxed DNA, respectively, in the presence and absence of RNase HI (Fig. 1b; hypernegatively supercoiled DNA is seen at bottom part of the curves at high chloroquine concentration ((right panels, indicated by [--])); extensively relaxed DNA is at the far right part of the curves at lower chloroquine concentration (left and middle panels; lines were traced over the more relaxed topoisomers)). Additional two-dimensional gel analyses showed that the more relaxed topoisomers were not positively supercoiled (data not shown). Thus, removal of RNase HI relaxed DNA of *topA* null cells and prevented the accumulation of hypernegatively supercoiled DNA rather than increasing it.

Supercoiling deficit in a *topA rnhA* null double mutant after transcription inhibition.

Excess negative supercoiling in *topA* mutants originates largely from transcription. To determine whether the reduced supercoiling in the *topA rnhA* double mutant is specific to transcription-induced supercoiling, mutant cells (strain PS151) were treated with rifampicin, an inhibitor of RNA polymerase. When rifampicin was added to a culture of *topA* null cells (strain PS152, containing wild-type RNase HI) before the temperature downshift, almost all of the hypernegatively supercoiled topoisomers were lost (Fig. 2, top panels). When RNase HI was absent and most of the DNA was seen as extensively relaxed topoisomers, rifampicin had little effect (Fig. 2, bottom panels; a line was traced over the more relaxed topoisomers). Thus the extensive relaxation of supercoiling seen in *topA rnhA* double mutants was related to global supercoiling rather than being specifically linked to transcription. However, our results also show that the effect of the *rnhA* deletion on supercoiling following a temperature downshift was much stronger when transcription was allowed (Fig. 2, compare –rif with +rif, + and – RNase HI).

Levels of topoisomerase IV and gyrase proteins are not altered by deletion of *rnhA* from *topA* null cells.

Changes in topoisomerase IV and gyrase concentrations were measured to address the possibility that levels of these proteins account for the extensive DNA relaxation associated with depletion of RNase HI activity in *topA* null cells. ParC and ParE were not overproduced in the *topA20::Tn10 gyrB* (Ts) mutant when RNase HI was depleted, as assessed by western blot experiments (Fig. 3, compare lanes 5 and 6 with lanes 7 and 8) and northern blot experiments (data not shown). GyrA and GyrB levels also exhibited no significant difference between the presence and absence of RNase HI (Fig. 3, compare lanes 5 and 6 with lanes 7 and 8).

Lack of significant change in ParC, ParE, GyrA and GyrB level was also observed when the *rnhA* gene was inactivated in the Δ *topA gyrB* (Ts) strain carrying pPH1243 (Fig. 3, lanes 1 to 4). This plasmid, which expressed *topB* (topoisomerase III) from an IPTG-inducible promoter, allowed the recovery of *rnhA::cam* transductants in a Δ *topA*

recipient strain, but only when IPTG was present (Fig. 4a and data not shown). Western blot experiments with a transductant (strain SB383) confirmed that overproduction of topoisomerase III occurred (Fig. 4b). Plasmid pPH1243 also allowed *topA rnhA* double mutants to grow unless cultures were diluted into IPTG-deficient medium, in which case growth eventually stopped during log phase. Thus, introduction of two restrictive conditions, depletion of RNase HI or removal of topoisomerase III overexpression failed to reveal changes in gyrase and topoisomerase IV concentrations that could explain the extensive DNA relaxation observed with *topA rnhA* double mutants.

Supercoiling in a *topA rnhA* double mutant is not significantly affected by quinolone-mediated inhibition of topoisomerase IV.

We also considered the possibility that supercoiling by gyrase was reduced. To test this hypothesis, we used the *gyrA*^{L83} allele to render gyrase resistant to norfloxacin, thereby allowing selective quinolone-mediated inhibition of topoisomerase IV, the only remaining relaxing activity in *topA* mutants (Zechiedrich *et al.*, 2000). The *gyrA*^{L83} allele was introduced into isogenic $\Delta topA$ *gyrB* (Ts) and $\Delta topA$ *gyrB* (Ts) *rnhA::cam* strains carrying pPH1243 to obtain, respectively, strains VU21 and PS160. Dilution into medium lacking IPTG gradually removed suppression of growth defect by topoisomerase III, but allowed enough growth for examination of plasmid supercoiling (as pointed out in a subsequent section, topoisomerase III overexpression has no effect on supercoiling).

Negative supercoiling increased at 37°C after inhibition of topoisomerase IV by norfloxacin in both the *topA rnhA* and the *topA* mutants following dilution (Fig. 5, compare *topA rnhA*, strain PS160, lanes 1 and 2 with *topA*, strain VU21, lanes 5 and 6). However, a significant proportion of the topoisomers remained relaxed in the *topA rnhA* mutant (Fig. 5, lane 2, indicated by [rel]). Following a shift to 28°C, the addition of norfloxacin to inhibit topoisomerase IV strongly stimulated the accumulation of hypernegatively supercoiled DNA in the *topA* mutant (Fig. 5, compare lanes 7 and 8, indicated by [--]), whereas it did not appreciably change the supercoiling level in the *topA rnhA* mutant (Fig. 5, compare lanes 3 and 4). Collectively these results show that topoisomerase IV is not responsible for the strong supercoiling deficit in *topA rnhA*

double mutants. It is likely that supercoiling by gyrase is impaired when both RNase HI and topoisomerase I are absent.

GyrI, a gyrase inhibitor, is not involved in supercoiling inhibition found in a *topA rnhA* double mutant.

GyrI is encoded by *sbmC*, a well-characterized inhibitor of gyrase (Nakanishi *et al.*, 1998; Chatterji and Nagaraja, 2002). Since GyrI is part of the SOS regulon (Baquero *et al.*, 1995), which is chronically expressed in *rnhA* mutants (Kogoma *et al.*, 1993; McCool *et al.*, 2004), it is expected to be at elevated levels in *topA rnhA* double mutants. To examine involvement of GyrI in the supercoiling inhibition in *topA rnhA* double mutants, an *sbmC::kan* allele was introduced into isogenic $\Delta topA$ *gyrB*(Ts) and $\Delta topA$ *gyrB*(Ts) *rnhA::cam* strains carrying pPH1243, to obtain, respectively, strains VU64 and VU70. Both extensive DNA relaxation and lack of hypernegative supercoiling, which are characteristic of the *topA rnhA* double mutant, were seen whether or not *sbmC* was present (Fig. 6, compare lanes 1 and 4 with lanes 2 and 5, respectively). The lack of a significant supercoiling effect from the absence of GyrI was also illustrated by comparing supercoiling in strains VU64 (Fig. 6, *rnhA*⁺, lanes 3 and 6) and VU70 (Fig. 6, *rnhA*⁻, lanes 2 and 5). Thus, GyrI is not responsible for the DNA relaxation seen in *topA rnhA* double mutants. We also examined a *lexA3* mutant in which the SOS regulon is non-inducible. DNA was relaxed, and hypernegative supercoiling was absent in a *lexA3 topA rnhA* mutant (not shown).

Cell extracts of a *topA rnhA* double mutant exhibit no supercoiling activity and significantly inhibit supercoiling of wild-type cell extracts.

The restoration of negative supercoiling is slow and requires a significant increase in the population cell density of strain PS151 (*topA rnhA* double mutant carrying pBAD*rnhA*) following the addition of arabinose to produce RNase HI (not shown). This result suggested involvement of one or more stable factors in inhibiting supercoiling in *topA rnhA* double mutants. To test this idea, we prepared extracts of wild-type (strain AQ634), *gyrB*(Ts) (strain MA249), *gyrB*(Ts) *topA* (strain PS152) and *gyrB*(Ts) *topA rnhA* (strain PS151) cells. Extracts from both wild-type and *gyrB*(Ts) strains exhibited

supercoiling activity (Fig. 7a), although with the *gyrB*(Ts) strain an endonuclease activity was also detected (lane 6). Maximum supercoiling activity was seen at 3.5 µg total protein in the reaction mixture for the *gyrB*(Ts) strain (lane 9); the same amount of protein from wild-type cells exhibited more supercoiling activity (compare wild-type, lane 4 with *gyrB*(Ts), lane 9), and a higher supercoiling level was achieved (not shown). Although supercoiling activity was also detected in crude extracts of *topA* null *gyrB*(Ts) cells (Fig. 7b, lanes 7 to 12, top panel), it was significantly lower than in extracts of isogenic *topA*⁺ *gyrB*(Ts) cells (Fig. 7a, lanes 6 to 10) and was better seen when the gel was probed with a [³²P]-labelled DNA fragment (Fig 7b, lanes 7 to 12, bottom panel). Even with radioactive probing, supercoiling activity was undetectable in extracts from the *topA rnhA* double mutant grown in the absence of arabinose to deplete RNase HI activity (Fig. 7b, lanes 1 to 6, bottom panel). These results are consistent with crude extracts of *topA rnhA* null cells containing factor(s) that significantly reduce supercoiling activity.

As a further test for factor(s) inhibiting supercoiling, aliquots of extracts from both *topA* and *topA rnhA* double mutant cells were mixed with extracts from wild-type cells. As shown in Fig. 7c, extracts from the *topA rnhA* double mutant significantly inhibited supercoiling activity of wild-type extracts (compare lanes 1 and 5, which used 2.5 µg protein from the wild-type cell extract with, respectively, 5 and 0 µg protein from the *topA rnhA* double mutant extract). In contrast, inhibition of supercoiling activity by the extract from *topA* null cells was weak (Fig. 7c, compare lanes 1 and 6, using 2.5 µg protein from the wild-type cell extract with 5 µg protein from the *topA rnhA* or the *topA* null extracts). Thus, a strong inhibitory activity present in extracts of *topA rnhA* double mutant explains the failure to detect supercoiling activity and may explain, at least in part, the impairment of supercoiling by gyrase in *topA rnhA* double mutants.

Topoisomerase III overproduction complements the growth defect of a *topA rnhA* double mutant without restoring supercoiling.

The data described above failed to relate the growth defect of *topA rnhA* double mutants to excess negative supercoiling. Since in *E. coli* topoisomerase III is not involved in the regulation of supercoiling (Zechiedrich *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2005), we expected DNA of *topA rnhA* double mutants to remain relaxed during suppression of

growth defect by overexpression of topoisomerase III. To test this hypothesis we made use of the finding that in a *topA* null mutant hypernegative supercoiling of pPH1243 is stimulated both by transcription from the strong *P_{trc}* promoter, which is activated by the addition of IPTG, and by translation inhibitors (Broccoli *et al.*, 2004; Broccoli and Drolet, unpublished results; spectinomycin was added 15 min before shifting from 37 to 28°C). In one experimental set, IPTG was added throughout growth at 37°C to overexpress topoisomerase III; in the second set, IPTG was added after spectinomycin so that the transcription effect of IPTG on pPH1243 supercoiling could be observed in the absence of excess topoisomerase III. Fig. 8 shows that pPH1243 exhibited hypernegative supercoiling upon adding IPTG, either before (lane 2) or after (lane 6) the addition of spectinomycin to the *topA* null mutant. In contrast, relaxation of pPH1243 was observed whether or not topoisomerase III was overproduced and irrespective of the presence of spectinomycin in the *topA rnhA* double mutant (Fig. 8, lanes 3, 4, 7 and, 8). Two-dimensional gel electrophoresis confirmed relaxation of pPH1243 (data not shown). As expected, supercoiling was restored in this *topA rnhA* double mutant following the introduction of a plasmid carrying the *rnhA* gene (data not shown), indicating that relaxation is reversible and due to the absence of RNase HI. Collectively, these data support the assertion that overexpression of topoisomerase III suppresses the growth defect of *topA rnhA* double mutants without restoring supercoiling.

Cells of a *topA rnhA* double mutant form long filaments packed with unevenly distributed DNA.

Despite the presence of a mechanism to prevent hypernegative supercoiling, *topA rnhA* double mutants do not grow without suppression. This result suggests the presence of supercoiling-independent mechanism(s) by which the absence of RNase HI dramatically perturbs cell physiology. As shown above, the growth defect of a *topA rnhA* double mutant can be rescued by overproducing topoisomerase III (Fig. 4), which can allow chromosome segregation by removing precatenanes during replication (Nurse *et al.*, 2003). We therefore examined the possibility that the growth inhibition of *topA rnhA* double mutants might be related to segregation defects.

Cells were stained with DAPI and prepared for fluorescence microscopy such that both cell morphology and DNA content could be examined. In the absence of topoisomerase III overproduction, cells of the *topA rnhA* double mutant (strain SB383) formed long filaments full of DNA, and nucleoid structures were altered (Fig. 9a, panel 2). Anucleate cells also accumulated (Fig. 9b, yellow arrows), as did cells with very low amounts of chromosomal DNA (Fig. 9b, green arrows). Formation of such cells could result from septum closure on nucleoids, a typical manifestation of partition defects (guillotine effect; Niki *et al.*, 1991). Clearly, the *topA rnhA* double mutant fails to produce a significant number of normal cells. However, more than half of the cells containing aberrant nucleoid structures likely remain viable, as cells of strain SB383 incubated in liquid medium lacking IPTG form colonies when plated on solid media containing IPTG to overproduce topoisomerase III (data not shown). Overproduction of topoisomerase III reduced both cell filamentation and DNA content, and it caused DNA to be more regularly distributed within the cells (Fig. 9a, panel 1). Topoisomerase III overproduction also reduced the number of anucleate cells by more than half. Segregation defects were also apparent in the *topA20::Tn10 rnhA::cam gyrB* (Ts) mutant carrying pBAD*rnhA* (strain PS151; Fig. 9a, panel 4, -ara); they were corrected by the addition of arabinose to produce RNase HI (panel 3, +ara). Moreover, cells of single *rnhA* and *topA* null mutants failed to show major morphological or nucleoid defects (Fig. 9c, panels 2 and 3 respectively). Thus, combinations of *topA* and *rnhA* null mutations lead to phenotypes reminiscent of segregation defects, thereby explaining the growth inhibition phenotype of *topA rnhA* double mutants.

Discussion

The work described above, which focused on the properties of *topA rnhA* double mutants, revealed new features of how DNA topology is regulated in bacterial cells. One level concerns DNA supercoiling. Basal supercoiling, which is defined as supercoiling in the absence of transcription (Drlica *et al.*, 1988), is set largely by the supercoiling activity of gyrase opposed by the relaxing activities of topoisomerase I and topoisomerase IV. Transcription, through the generation of R-loops coupled with gyrase activity, produces hypernegative supercoiling that is countered by topoisomerase I and RNase HI. The growth defect associated with a deficiency of topoisomerase I is suppressed by partially defective gyrase, overexpression of topoisomerase IV, or overexpression of RNase HI. Surprisingly, *topA rnhA* null double mutants not only lacked hypernegative supercoiling but also contained DNA that was relaxed (Fig. 1 and 8). Evidence was found for the interesting possibility that RNase HI normally regulates factor(s) impairing supercoiling by gyrase. A second level of topology control concerns decatenation of replicated chromosomes. Decatenation is largely a function of topoisomerase IV (Zechiedrich and Cozzarelli, 1995). In our work, a *topA rnhA* double mutant exhibited a defect in chromosome segregation that was corrected by overexpression of topoisomerase III (Fig. 9), an enzyme that has no effect on supercoiling and is capable of decatenation both *in vitro* and *in vivo* (Hiasa *et al.*, 1994; Nurse *et al.*, 2003). Thus RNase HI, either directly or indirectly, influences both basal levels of supercoiling and chromosome segregation as discussed in the following sections.

Supercoiling in *topA rnhA* double mutants.

Previous work showed that gyrase-mediated hypernegative supercoiling occurs during transcription *in vitro* in the absence of RNase HI (Drolet *et al.*, 1994; Phoenix *et al.*, 1997) and in *topA* null mutants when RNase HI is not overproduced (Massé and Drolet, 1999c). We expected removal of *rnhA* from *topA* mutants to lead to extensive hypernegative supercoiling, since cells lacking both topoisomerase I and RNase HI cannot be constructed (Massé and Drolet, 1999c; Drolet *et al.*, 1995). Unexpectedly, hypernegative supercoiling failed to accumulate in *topA rnhA* double mutants that had been constructed by conditional expression of *rnhA* or *topB*. However, DNA of such mutants was more relaxed than usual. Relaxation was not an indirect consequence of cell

death, because deleting *rnhA* in *topA* null mutants was bacteriostatic, not bactericidal. When arabinose was added to non-growing *topA rnhA* null cells carrying pBAD*rnhA* to induce the synthesis of RNase HI, both growth and supercoiling were restored. More importantly, DNA remained extensively relaxed in a *topA rnhA* double mutant when cell growth was restored by overproducing topoisomerase III. Only when a plasmid carrying *rnhA* was introduced into this mutant that supercoiling was also restored. Therefore, DNA relaxation correlated with depletion of RNase HI activity in *topA* mutants.

Since supercoiling level is set primarily by opposing topoisomerase activities, we considered the possibility that the supercoiling deficit in *topA rnhA* null double mutants was due either to an excess of DNA relaxation activity by topoisomerases or to a loss of gyrase supercoiling activity. One well established mechanism by which excess negative supercoiling is prevented in *topA* mutants is the overproduction of topoisomerase IV (Kato *et al.*, 1990; Free and Dorman, 1994). However, western blot experiments showed that topoisomerase IV is not overproduced in *topA* null cells lacking RNase HI activity. Moreover, inhibition of topoisomerase IV by norfloxacin failed to significantly raise supercoiling in a *topA rnhA* double mutant carrying the *gyrA*^{L83} quinolone-resistance allele. Thus topoisomerase IV was not responsible for the supercoiling deficit in *topA rnhA* double mutants. In agreement with the results of previous experiments showing that topoisomerase III is not involved in supercoiling regulation in *E. coli* (Zechiedrich *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2005), overproducing this enzyme had no effect on supercoiling in either *topA* single or *topA rnhA* double mutants. Therefore, relaxation activity of topoisomerases is unlikely to explain the supercoiling deficit in *topA* null cells depleted of RNase HI activity.

Western blot experiments also demonstrated that levels of gyrase protein were not altered following the depletion of RNase HI activity in *topA* mutants. Two experiments indicated that the supercoiling deficit is related to impairment of supercoiling by gyrase. First, while inhibiting topoisomerase IV by norfloxacin in a single *topA* null mutant strongly promoted hypernegative supercoiling, it did not significantly stimulate supercoiling in a double *topA rnhA* null mutant. Second, supercoiling activity could not be detected in cell extracts of a *topA rnhA* null double mutant (strain PS151), and these extracts significantly inhibited the supercoiling activity when mixed with extracts from

wild-type cells. Thus, the supercoiling deficit in *topA* null cells depleted of RNase HI activity is likely related to a cellular response that leads to the inhibition of gyrase.

The cellular response leading to the impairment of gyrase activity in double *topA rnhA* null mutants is currently unknown. The response is related neither to the SOS regulon, which is constitutively induced in the absence of RNase HI (Kogoma *et al.*, 1993; McCool *et al.*, 2004), nor to the presence of the gyrase inhibitor, GyrI, a member of the SOS regulon (Baquero *et al.*, 1995). Previous results also failed to demonstrate an effect of GyrI on supercoiling *in vivo* (Chatterji *et al.*, 2003). While supercoiling by gyrase can be prevented by a direct interaction between the enzyme and a specific inhibitor acting like GyrI, it may also be inhibited by low [ATP]/[ADP] (Westerhoff *et al.*, 1998; Drlica, 1992) and indirectly by proteins that interact with DNA, such as the abundant nucleoid proteins Fis, H-NS and HU (Travers and Muskhelishvili, 2005ab). Additional experiments are required to work through the many possible ways in which gyrase activity can be lowered.

Segregation defect and growth inhibition suppressed by topoisomerase III.

The growth inhibition associated with *topA rnhA* double mutants correlated with phenotypes seen previously with chromosomal segregation defects: extensive cell filamentation, abnormal nucleoid structures, and accumulation of anucleate cells. Thus, the simultaneous absence of topoisomerase I and RNase HI leads to segregation defects not observed with cells lacking only one of the enzymes. R-loops may be involved, since a relationship between topoisomerase I and RNase HI is well established. If R-loops persist in *topA rnhA* double mutants, particularly at *oriK* sites where constitutive, stable DNA replication is initiated (Kogoma, 1997), excess replication could occur. Over-replication may saturate the segregation capacity of the cell, thus requiring more decatenation activity than can be provided by excess topoisomerase III.

Unregulated over-replication is also known to lead to collapse of replication forks, DNA double-strand breaks (Kouziminova *et al.*, 2004; Simmons *et al.*, 2004; Michel *et al.*, 2007), and ultimately hyper-recombination, which can cause segregation defects (Lopez *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2001; Zahradka *et al.*, 1999; Magner *et al.*, 2007). Accumulation of unresolved recombination intermediates interferes with chromosome

segregation; resolution of these structures can be performed by topoisomerase III (Lopez *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2001), even when it is present at normal or very low levels (less than 10 copies per cell; Digate and Mariani, 1989).

The extensive DNA relaxation in *topA rnhA* double mutants could also contribute to segregation defects, since the inhibitory effect of temperature-sensitive gyrase mutations on segregation (Steck and Drlica, 1984) is thought to be due to DNA relaxation that then suppresses decatenation by topoisomerase IV (Zechiedrich *et al.*, 1997; Holmes and Cozzarelli, 2000). Overproduction of topoisomerase III allows chromosome segregation when topoisomerase IV is inactive (Nurse *et al.*, 2003). However, in the context of extensive DNA relaxation, the ability of topoisomerase III to perform decatenation might be reduced because single-stranded DNA regions, the substrate for topoisomerase III, are expected to be infrequent. Such regions can also be provided by R-loops (Broccoli *et al.*, 2000).

Biological function of RNase HI

The first function attributed to RNase HI in *E. coli* was a role in the removal of RNA primers of Okazaki fragments (Funnell *et al.*, 1986; Ogawa and Okazaki, 1984). However, this enzyme cannot remove the last ribonucleotides at the RNA-DNA junctions. In fact, 5'-3' exonuclease activity (e.g. polymerase I) plays the major role in the removal of RNA primers. Interestingly, RNase H activity in various bacterial species was recently shown to be dispensable for complete RNA primer removal (Fukushima *et al.*, 2007). Only 5'-3' exonuclease activity was shown to be indispensable for this process. Based on the results presented in the present work we propose that a major function of RNase HI, and possibly other bacterial RNase H molecules, involves the control of DNA topology via R-loops.

Experimental procedures

***E. coli* strains.** *Escherichia coli* strains used in this work are described in Table 1. Strains were constructed by transduction with phage P1*vir* as previously described (Miller, 1992). When needed, tetracycline (10 µg/ml), chloramphenicol (15 µg/ml) or kanamycin (50 µg/ml) was added to the medium. PCR was used to confirm the presence of only the *rnhA::cam* allele and the *sbmC::kan* allele, respectively, on the chromosome of the *rnhA* null and the *sbmC* null transductants.

Plasmids. pBAD18*rnhA* was constructed by placing an EcoRI-HindIII fragment carrying the *rnhA* gene under the control of the P_{BAD} promoter of pBAD18 (Guzman *et al.*, 1995). The *rnhA* gene was obtained by PCR from pSK760 (Drolet *et al.*, 1995) by using d(GTCAGAATTCCAGGAAGTCTACCAGA) and d(GTCAAAGCTTGGCAATGTCGTAAACC) oligonucleotides. pGB2*nusB::kan* is a pSC101 derivative that was constructed by inserting the pUC4K EcoRI fragment carrying a kanamycin-resistance cassette into the ScaI site of pGB2*nusB* (Friedman *et al.*, 1990). pPH1243 is a pTrec99a derivative carrying the *topB* gene under the control of the IPTG-inducible *P_{trc}* promoter (Broccoli *et al.*, 2000).

Plasmid extraction for supercoiling analysis. Cells were grown overnight at 37°C in LB medium supplemented with cysteine (50 µg/ml, for the RFM475 derivatives), thymine (10 µg/ml, for the MA251 derivatives) or tryptophan (50 µg/ml, for VU35 and VU95 strains). When required, ampicillin (50 µg/ml), spectinomycin (30 µg/ml), arabinose (0.05%) or IPTG (1 mM) were added. Overnight cultures diluted in pre-warmed medium (37°C), were grown to an OD₆₀₀ of ~0.5 at which time an aliquot of cells was recovered for plasmid extraction while the remaining culture was transferred to 28°C. Aliquots of cells were recovered for plasmid extraction at the indicated times. Growth was arrested by transferring cells into a tube filled with ice, thus immediately lowering the temperature of the culture to 0°C. Plasmid DNAs were extracted by alkaline lysis as previously described (24). For experiments using derivatives of MA251,

overnight cultures were diluted 1:1000; they were diluted to an OD₆₀₀ of 0.03 for the experiments using SB383, VU21, PS160, VU64, and VU70.

Plasmid topoisomer analysis. One-dimensional and two-dimensional agarose gel electrophoresis in the presence of chloroquine was performed in 0.5 X TBE as described (Massé *et al.*, 1997). After electrophoresis, the gels were dried and prepared for *in situ* hybridization with random prime-labelled probes as described (Massé *et al.*, 1997). Images were obtained by using a Phosphorimager Typhoon 9400 (Amersham Biosciences).

Western blot analysis. The equivalent of 200 µl of cell culture at an OD₆₀₀ of 0.7 was used for Western blot analysis. The cell pellets were lysed by boiling in sodium dodecyl sulphate (SDS). The proteins were separated by SDS-polyacrylamide (7.5 %) gel electrophoresis. Western blots were performed as described previously (Sambrook *et al.*, 1989) by using nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, GE Healthcare). After transfer, the membranes were stained with Ponceau S (Fisher Scientific) to confirm that similar amounts of protein were loaded in each lane. ParC and ParE antibodies were obtained from Dr Kenneth J. Mariani (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, New York). GyrA and GyrB antibodies were purchased from John Innes Enterprises Ltd (John Innes Centre, Norwich Research Park Colney, Norwich, UK). TopB antibodies were obtained from Dr Russell DiGate (Department of Pharmaceutical Sciences, Philadelphia College of Pharmacy, Philadelphia, PA). The ECL Plus detection kit (GE Healthcare) was used to reveal the specific proteins.

Gyrase assays in crude cell extracts. Cells were grown in LB medium at 37°C to an OD₆₀₀ of 0.7 and transferred to 28°C for 30 minutes. Cells were recovered and prepared for gyrase assays in crude extracts as previously described (DiNardo *et al.*, 1982). 0.2 µg of relaxed pBR322 DNA (prepared by using wheat germ topoisomerase I from Sigma-Aldrich) was used in the assays.

Microscopy. RFM443, RFM475, PH379 and SB383 cells were grown overnight on LB plates supplemented, when required, with cysteine (50 µg/ml), ampicillin (50 µg/ml),

chloramphenicol (10 µg/ml) and/or tetracycline (10 µg/ml). When needed, IPTG (1 mM) was added to the plates of SB383 cells. PS151 cells were grown overnight on LB plates supplemented with thymine (50 µg/ml) and, when needed, arabinose (0.05%). The plates were incubated at 37°C. After overnight growth, cells were resuspended in pre-warmed (37°C) liquid LB medium (supplemented as requested) to obtain a starting OD₆₀₀ of about 0.01. Cells were grown at 37°C to an OD₆₀₀ of 0.8. 150 µl of cells were harvested, centrifuged, and resuspended in 77% ethanol (fixing solution). The cells were washed with 500 µl of 0.9% NaCl, centrifuged and resuspended in 100 µl of 0.9% NaCl. 3 µl of the fixed samples were spread on slides pre-treated with a Poly-L-Lysine solution (Sigma) and allowed to air dry at room temperature. 5 µl of slow fade gold antifade reagent with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; from Invitrogen) was deposited on the slides and sealed with a cover glass. Fluorescence pictures were obtained with a Nikon E600 equipped with a 100-W mercury lamp and standard DAPI filters using the X100 oil immersion objective. The images were captured on the computer using the Nikon ACT-1 software. Exposure time was 1/50s at maximum sensitivity. For phase contrast microscopy, the microscope was adjusted to the phase contrast optical system and pictures were taken at X100 oil immersion objective with the Ph3 annulus. Exposure time was 1/120s at normal sensitivity. The images were processed with Adobe Photoshop.

References

- Baaklini, I., Hraiky, C., Rallu, F., Tse-Dinh, Y.-C. and Drolet, M (2004) RNase HI is required for efficient full-length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**: 198-211.
- Baquero, M.R., Bouzon, M., Varea, J. and Moreno, F. (1995) *sbmC*, a stationary-phase induced SOS *Escherichia coli* gene, whose product protects cells from the DNA replication inhibitor microcin B17. *Mol Microbiol* **18**: 301-311.
- Broccoli, S., Phoenix, P., and Drolet, M. (2000) Isolation of the *topB* gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of *topA* null mutations in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **35**: 58-68.
- Broccoli, S., Rallu, F., Sanscartier, P., Cerritelli, S.M., Crouch, R.J. and Drolet, M (2004) Effects of RNA polymerase modifications on transcription-induced supercoiling and associated R-loop formation. *Mol Microbiol* **52**: 1769-1779.
- Chatterji, M., and Nagaraja, V. (2002) GyrI: a counter-defensive strategy against proteinaceous inhibitors of DNA gyrase. *EMBO Rep.* **3**: 261-267.
- Chatterji M., Sengupta S. and Nagaraja, V. (2003) Chromosomally encoded gyrase inhibitor GyrI protects *Escherichia coli* against DNA-damaging agents. *Arch Microbiol* **180**: 339-346.
- DiGate, R.J. and Mariani, K.J. (1989) Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli topB*, the gene encoding topoisomerase III. *J Biol Chem* **264**: 17924-17930.
- DiNardo, S., Voelkel, K.A., Sternglanz, R., Reynolds, A.E. and Wright, A (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* **31**: 43-51.

- Drlica, K., Franco, R.J. and Steck, T.R. (1988) Rifampin and *rpoB* mutations can alter DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 4983-4985.
- Drlica, K. (1992) Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol* **6**: 425-433.
- Drolet, M. (2006) Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol Microbiol* **59**: 723-730.
- Drolet, M., Bi, X. and Liu, L.F (1994) Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation *in vitro*. *J Biol Chem* **269**: 2068-2074.
- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, E., Liu, L.F. and Crouch, R.J (1995) Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3526-3530.
- Free, A. and Dorman, C. J. (1994) *Escherichia coli tyrT* gene transcription is sensitive to DNA supercoiling in its native chromosomal context: effect of DNA topoisomerase IV overexpression on *tyrT* promoter function. *Mol Microbiol* **14**: 151-161.
- Friedman, D.I., Olson, E.R., Johnson, L.L., Alessi, D., and Craven, M.G. (1990) Transcription-Dependent Competition for a Host Factor - the Function and Optimal Sequence of the Phage-Lambda-Boxa Transcription Antitermination Signal. *Genes Dev* **4**: 2210-2222.
- Fukushima, S., Itaya, M., Kato, H., Ogasawara, N. and Yoshikawa, H. (2007) Reassessment of the *in vivo* functions of DNA polymerase I and RNase H in bacterial cell growth. *J. Bacteriol.* **189**: 8575-8583.

- Funnell, B.E., Baker, T.A. and Kornberg, A (1986) Complete enzymatic replication of plasmids containing the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem.* **261**: 5616-5624.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121-4130.
- Hiasa, H., DiGate, R.J. and Marians, K.J. (1994) Decatenating activity of *Escherichia coli* DNA gyrase and topoisomerases I and III during *oriC* and pBR322 DNA replication *in vitro*. *J Biol Chem* **269**: 2093-2099.
- Holmes, V.F., and Cozzarelli, N.R. (2000) Closing the ring: Links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 1322-1324.
- Hraiky, C., Raymond, M.A. and Drolet, M (2000) RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **275**: 11257-11263.
- Itaya, M., and Crouch, R.J. (1991) Correlation of activity with phenotypes of *Escherichia coli* partial function mutants of *rnh*, the gene encoding RNase H. *Mol Gen Genet* **227**: 433-437.
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S. and Suzuki, H (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* **63**: 393-404.
- Kogoma, T., Hong, X., Cadwell, G.W., Barnard, K.G. and Asai, T. (1993) Requirement of homologous recombination functions for viability of the *Escherichia coli* cell that lacks RNase HI and exonuclease V activities. *Biochimie* **75**:89-99.

- Kogoma, T. (1997) Stable DNA replication: interplay between DNA replication homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 212-238.
- Kouzminova, E.A., Rotman, E., Macomber, L., Zhang, J. and Kuzminov, A. (2004) RecA-dependent mutants in *Escherichia coli* reveal strategies to avoid chromosomal fragmentation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:16262-16267.
- Lopez, C.R., Yang, S., Deibler, R.W., Ray, S.A., Pennington, J.M., DiGate, R.J., Hastings, P.J., Rosenberg, S.M., and Zechiedrich, E.L. (2005) A role for topoisomerase III in a recombination pathway alternative to RuvABC. *Mol. Microbiol.* **58**: 80-101.
- Magner, D.B., Blankschien, M.D., Lee, J.A., Pennington, J.M., Lupski, J.R. and Rosenberg, S.M. (2007) RecQ Promotes Toxic Recombination in Cells Lacking Recombination Intermediate-Removal Proteins. *Mol Cell* **26**:273-286.
- Massé, E. and Drolet, M. (1999a) Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **274**, 16654-16658.
- Massé, E., Drolet, M (1999b) R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli topA* mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J Mol Biol* **294**: 321-332.
- Massé, E., Drolet, M (1999c) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem* **274**: 16659-16664.

- Massé, E., Phoenix, P. and Drolet, M (1997) DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**: 12816-12823.
- McCool, J.D., Long, E., Petrosino, J.F., Sandler, H.A., Rosenberg, S.M. and Sandler, S.J. (2004) Measurement of SOS expression in individual *Escherichia coli* K-12 cells using fluorescence microscopy. *Mol Microbiol* **53**:1343-1357.
- Menzel, R., and Gellert, M. (1983) Regulation of the Genes for *Escherichia Coli* DNA Gyrase - Homeostatic Control of DNA Supercoiling. *Cell* **34**: 105-113.
- Michel, B., Boubakri, H., Baharoglu, Z., Lemasson, M. and Lestini, R. (2007) Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair (Amst)* **6**: 967-980.
- Miller, J.H. (1992) A Short Course in Bacterial Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Nakanishi, A., Oshida, T., Matsushita, T., Imajoh-Ohmi, S. and Ohnuki, T. (1998) Identification of DNA gyrase inhibitor (GyrI) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **273**:1933-1938.
- Niki, H., Jaffe, A., Imamura, R., Ogura, T. and Hiraga, S. (1991) The new gene *mukB* codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *EMBO J* **10**:183-193.
- Nurse, P., Levine, C., Hassing, H and Mariani, K.J. (2003) Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**: 8653-8660.
- Ogawa T. and Okazaki, T. (1984) Function of RNase H in DNA replication revealed by RNase H defective mutants of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **193**:231-237.

- Phoenix, P., Raymond, M.A., Massé, E. and Drolet, M (1997) Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J Biol Chem* **272**: 1473-1479.
- Pruss, G. J. (1985) DNA topoisomerase I mutants. Increased heterogeneity in linking number and other replicon-dependent changes in DNA supercoiling. *J Mol Biol* **185**: 51-63.
- Pruss, G.J., Manes, S.H. and Drlica, K (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* **31**: 35-42.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Simmons, L.A., Breier, A.M., Cozzarelli, N.R. and Kaguni, J.M. (2004) Hyperinitiation of DNA replication in *Escherichia coli* leads to replication fork collapse and inviability. *Mol Microbiol* **51**: 349-358.
- Steck, T.R. and Drlica, K. (1984) Bacterial chromosome segregation: evidence for DNA gyrase involvement in decatenation. *Cell* **36**: 1081-1088.
- Sternglanz R, DiNardo S, Voelkel K.A., Nishimura Y., Hirota Y., Becherer K., Zumstein L. and Wang J.C. (1981) Mutations in the gene coding for *Escherichia coli* DNA topoisomerase I affect transcription and transposition. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 2747-2751.
- Stupina, V.A. and Wang, J.C. (2005) Viability of *Escherichia coli topA* mutants lacking DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* **280**: 355-360.
- Travers, A. and Muskhelishvili, G. (2005a) Bacterial chromatin. *Curr Opin Genet Dev* **15**: 507-514.

- Travers, A. and Muskhelishvili, G. (2005b) DNA supercoiling - a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat Rev Microbiol* **2**: 157-169.
- Westerhoff H.V., O'Dea M.H., Maxwell A. and Gellert, M. (1988) DNA supercoiling by DNA gyrase. A static head analysis. *Cell Biophys.* **12**: 157-181.
- Zahradka, D., Vlahovic, K., Petranovic, M. and Petranovic, D. (1999) Chromosome segregation and cell division defects in *recBC sbcBC ruvC* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 6179-6183.
- Zechiedrich E.L. and Cozzarelli N.R. (1995) Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **9**: 2859-2869.
- Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B. and Cozzarelli, N.R. (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **11**:2580-2592.
- Zechiedrich EL, K.A., Bachellier S, Schneider R, Chen D, Lilley DM and Cozzarelli NR (2000) Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 8103-8113.
- Zhu, Q., Pongpech, P., and DiGate, R.J. (2001) Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9766-9771.

Acknowledgements: We thank Dr Russell DiGate and Kenneth Mariani for antibodies and Dr Nicholas Cozzarelli for LZ1 strain. We also thank Patrick Hallenbeck for editing of the manuscript. This work was supported by grant FNR 12667 from the CIHR to M.D and NIH grant AI35257 to K.D. M.D. was a Chercheur-Boursier Senior from the FRSQ.

Table 1. *Escherichia coli* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source or Ref.
AQ634	<i>ilv metB his-29 trpA9605 pro thyA deoB</i> (or <i>C</i>)	Hraiky <i>et al.</i> , 2000
MA249	AQ634 <i>gyrB221</i> (cou ^R) <i>gyrB203</i> (Ts) <i>zie-3163::Tn10kan</i>	Hraiky <i>et al.</i> , 2000
MA251	MA249 <i>gyrB221</i> (cou ^R) <i>gyrB203</i> (Ts) <i>zie-3163::Tn10kan</i> <i>topA20::Tn10</i>	Hraiky <i>et al.</i> , 2000
CM23	MA251 pBAD18 <i>rnhA</i>	This work
RFM430	<i>rpsL, galK2, ΔtrpE</i>	Drolet <i>et al.</i> , 1995
MIC1020	AB1157 <i>rnhA::cam</i>	Itaya and Crouch, 1991
PH379	RFM430 <i>rnhA::cam</i>	This work
PS147	CM23 <i>rnhA::cam</i>	This work
PS151	PS147 pGB2 <i>nusB::kan</i>	This work
PS152	MA251 pGB2 <i>nusB::kan</i>	This work
RFM445	<i>rpsL galK2 gyrB221</i> (cou ^R) <i>gyrB203</i> (Ts) <i>Δlac74</i>	Drolet <i>et al.</i> , 1995
RFM475	<i>rpsL galK2 gyrB221</i> (cou ^R) <i>gyrB203</i> (Ts) <i>Δ(topA cysB)204 Δlac74</i>	Drolet <i>et al.</i> , 1995
SB224	RFM475 pPH1243	This work
SB383	SB224 <i>rnhA::cam</i>	This work
LZ1	Hfr <i>thi gyrA</i> ^{L83} <i>zei-723::Tn10</i>	Zechiedrich <i>et al.</i> , 2000
PS158	RFM475 <i>gyrA</i> ^{L83} <i>zei-723::Tn10</i>	This work
VU21	PS158 pPH1243	This work

PS160	SB383 <i>gyrA</i> ^{L83} <i>zei-723::Tn10</i>	This work
VU48	MG1655 <i>sbmC::kan</i>	Carmen Gomez- Eichelmann
VU56	RFM475 <i>sbmC::kan</i>	This work
VU64	VU56 pPH1243	This work
VU70	VU64 <i>rnhA::cam</i>	This work

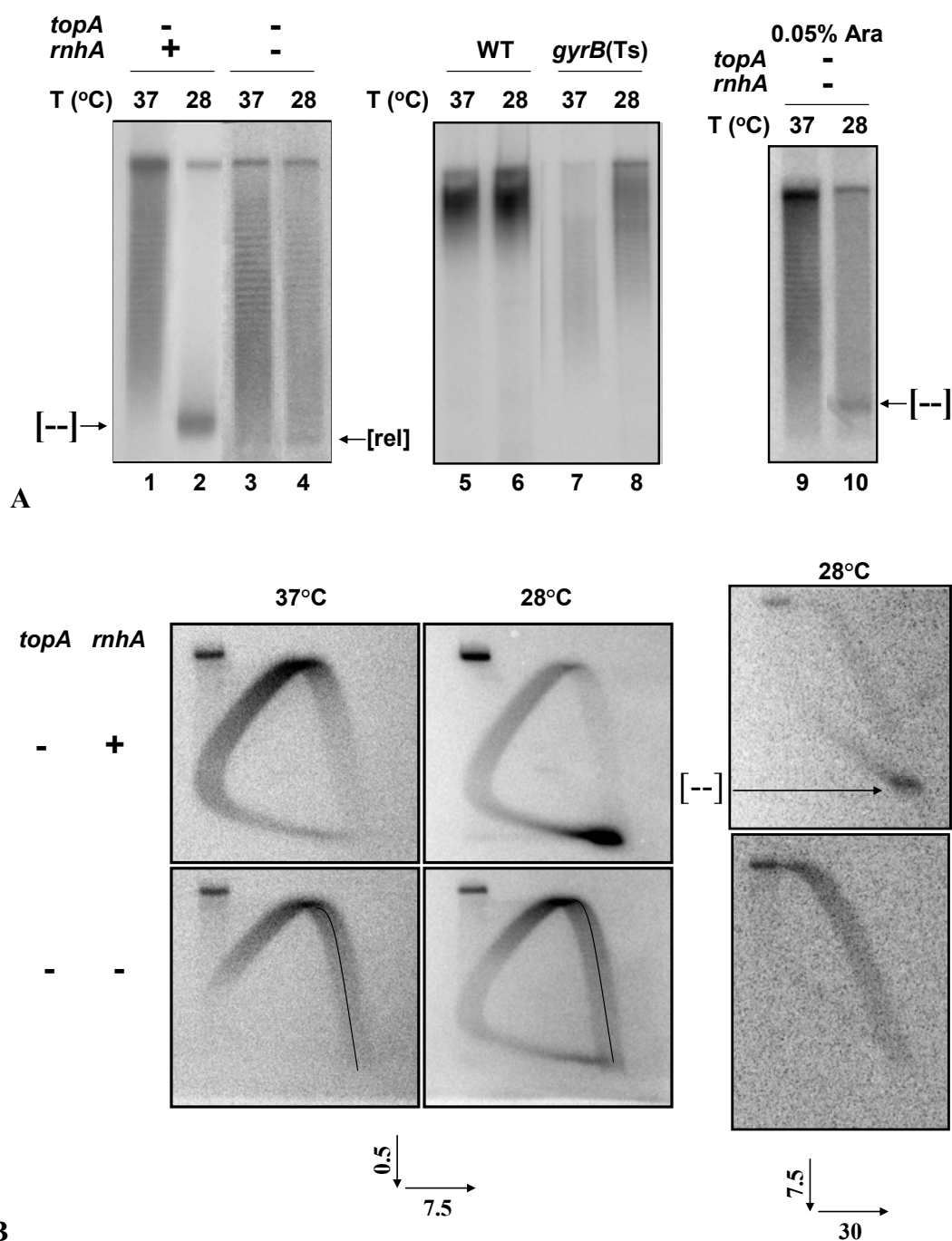


Figure 1. Supercoiling in a *topA rnhA* null double mutant. AQ634 (wild-type), MA249 (*gyrB*(Ts)), PS152 (*topA*⁻, *rnhA*⁺/pGB2nusB::kan) and PS151 (*topA*⁻, *rnhA*⁻/pGB2nusB::kan and pBAD18*rnhA*) cells were grown overnight at 37°C in the absence of arabinose. Overnight cultures were diluted 1:1000 in LB medium with or without arabinose (0.05%) as indicated and grown at 37°C. DNA was extracted just before the

temperature downshift and 60 minutes after the downshift (28°C). DNA samples were loaded on agarose gels for 1-D (with 7.5 µg/ml of chloroquine in (A) or 2-D (chloroquine concentrations in µg/ml are indicated by arrows in (B) electrophoresis. The gels were hybridized with a probe to detect pGB2nusB::kan. [--] points to hypernegatively supercoiled DNA. [rel] indicates extensively relaxed DNA. In (B), lines were traced over the more relaxed topoisomers.

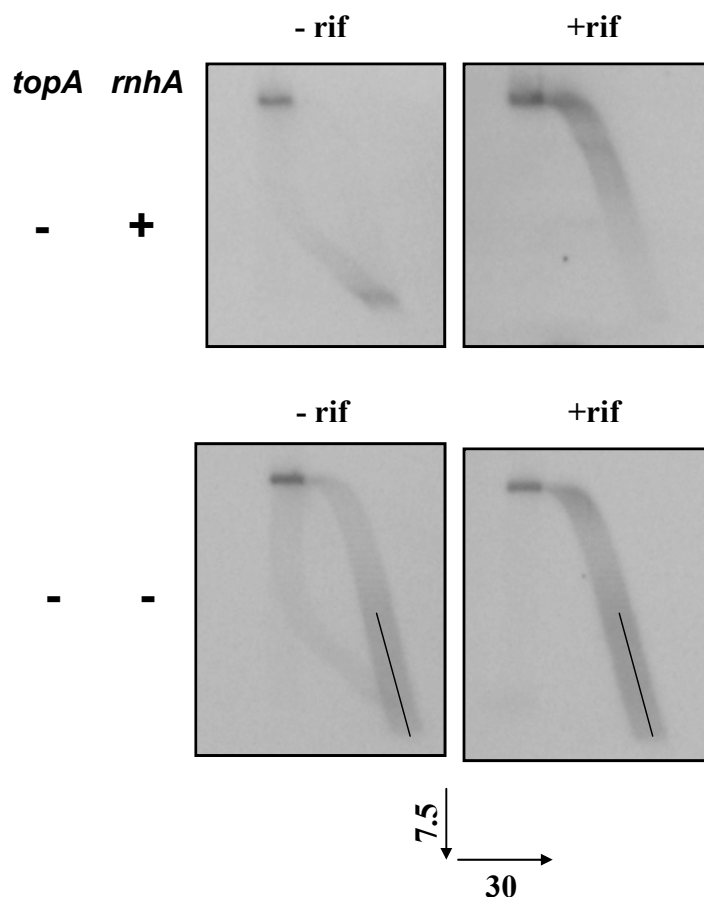


Figure 2. Supercoiling in a *topA rnhA* null double mutant after transcription inhibition. PS152 (*topA*⁻, *rnhA*^{+/} pGB2nusB::kan) and PS151 (*topA*⁻, *rnhA*⁻/ pGB2nusB::kan and pBAD18*rnhA*) cells were grown at 37°C in the absence of arabinose as indicated in the legend to Fig. 1. Rifampicin (250 µg/ml) was added or not as indicated, 15 minutes before the temperature downshift and the DNA was extracted 60 min after the downshift (28°C). DNA samples were loaded on an agarose gel for 2-D electrophoresis (chloroquine concentrations in µg/ml are indicated by arrows). The gel was hybridized with a probe to detect pGB2nusB::kan. Lines were traced over the more relaxed topoisomers (bottom panels).

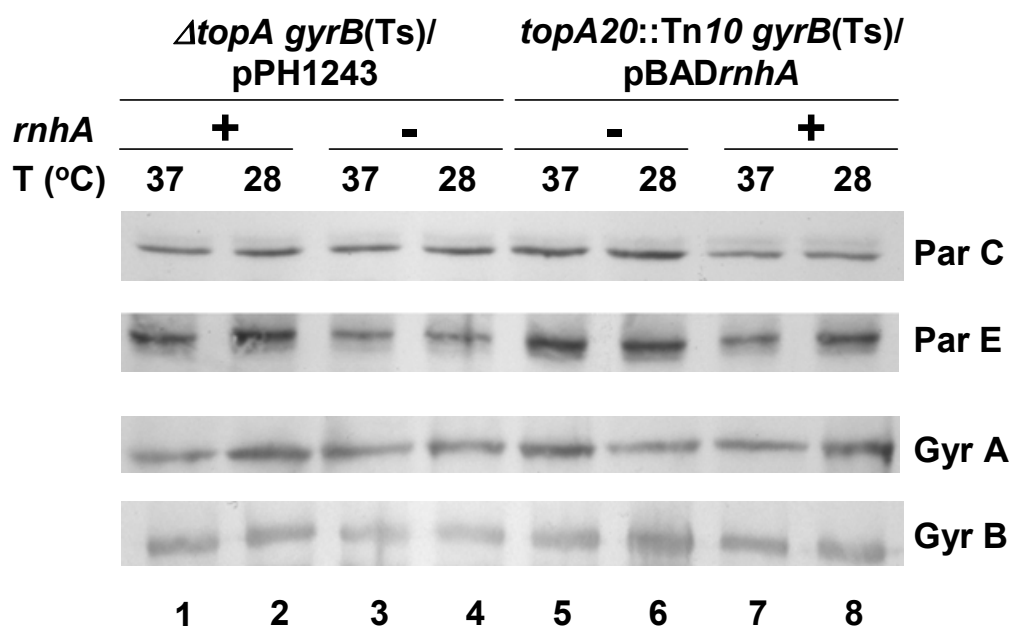


Figure 3. Western blot analysis to measure topoisomerase IV and gyrase levels in *topA rnhA* mutants. RFM475 (*gyrB(Ts) ΔtopA*), SB383 (*gyrB(Ts) ΔtopA rnhA::cam/pPH1243*), PS147 (*gyrB(Ts) topA20::Tn10 rnhA::cam/pBAD18rnhA*) and MA251 (*gyrB(Ts) topA20::Tn10*) cells were grown at 37°C in LB medium (no IPTG, no arabinose). Aliquots of cells were used for western blots as described in Experimental procedures. Lanes 1, 3, 5 and 7, aliquots of cells grown at 37°C; lanes 2, 4, 6 and 8, aliquots of cells exposed to 28°C for one hour.

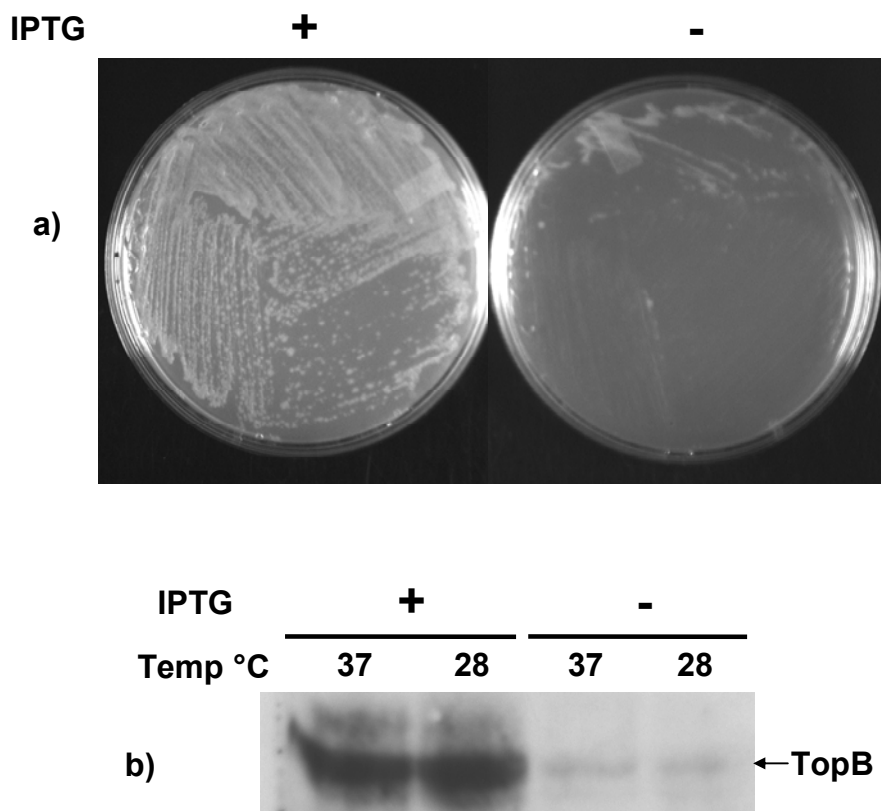


Figure 4. Complementation of a *topA rnhA* mutant by topoisomerase III overproduction. In (A) SB383 (*gyrB*(Ts) Δ *topA rnhA::cam*/pPH1243) cells were streaked on solid LB medium with 1 mM or no IPTG as indicated. The plates were incubated overnight at 37°C. In (B) SB383 cells were grown in LB at 37°C with or without 1 mM IPTG as indicated and aliquots were used for western blots with anti-topoisomerase III antibodies. Aliquots were also obtained from cells 60 min after a temperature downshift to 28°C.

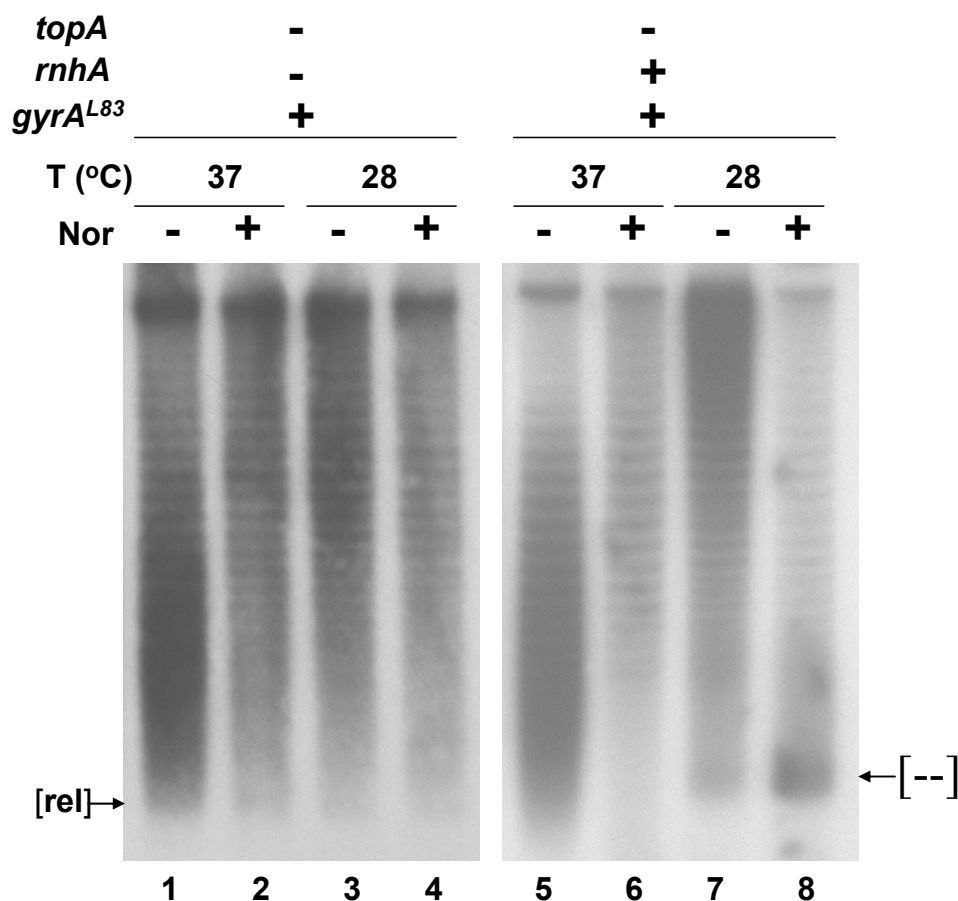


Figure 5. Topoisomerase IV inhibition does not promote hypernegative supercoiling in a double *topA rnhA* mutant. PS160 (*topA*⁻, *rnhA*⁻ *gyrA*^{L83}/pPH1243) and VU21 (*topA*⁻, *rnhA*⁺ *gyrA*^{L83}/pPH1243) cells were grown at 37°C in LB without IPTG to log phase and norfloxacin (60 µM final) was added or not as indicated. Aliquots of cells were taken for DNA extraction 30 min later and the remaining cells were transferred to 28°C. 30 min later aliquots of cells were taken for DNA extraction. DNA was analyzed in an agarose gel with 7.5 µg/ml chloroquine. The gel was hybridized with a probe to detect pPH1243 topoisomers. [--] point to hypernegatively supercoiled DNA. [rel] indicates extensively relaxed DNA.

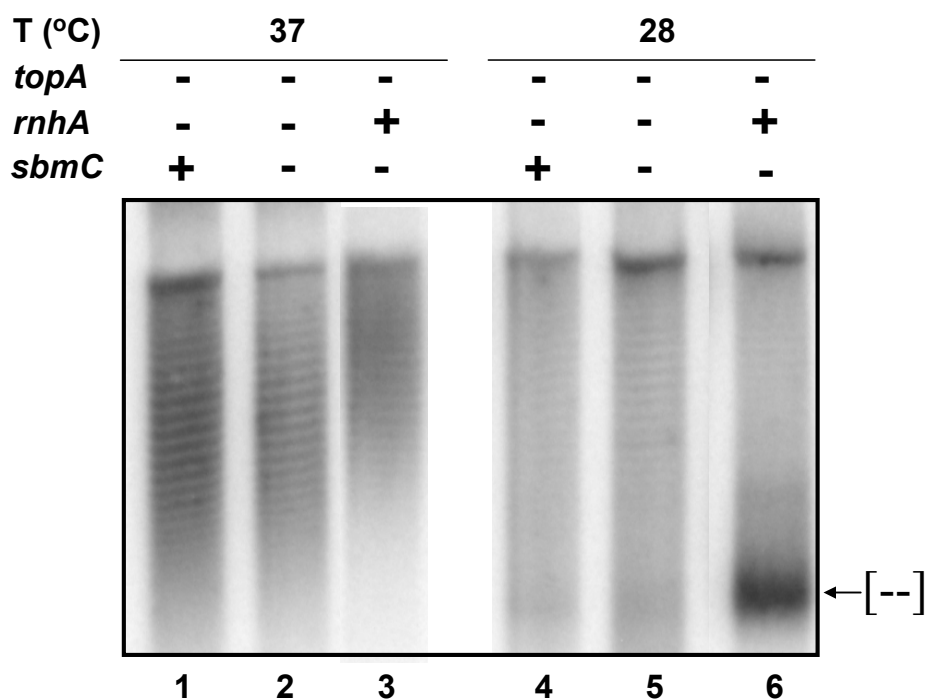


Figure 6. GyrI, a gyrase inhibitor, plays no role in supercoiling inhibition in a *topA* *rnhA* null double mutant. SB383 (*topA*⁻, *rnhA*⁻, *sbmC*⁺/pPH1243), VU70 (*topA*⁻, *rnhA*⁻, *sbmC*⁻/pPH1243) and VU64 (*topA*⁻, *rnhA*⁺, *sbmC*⁻/pPH1243) cells were grown at 37°C in the presence of 1 mM ITPG. Spectinomycin was added to 400 µg/ml 15 min before the temperature downshift to 28°C. DNA was extracted 60 min after the downshift and samples were loaded on an agarose gel (with 7.5 µg/ml of chloroquine) for 1-D electrophoresis. The gel was hybridized with a probe to detect pPH1243 topoisomers. [--] point to hypernegatively supercoiled DNA.

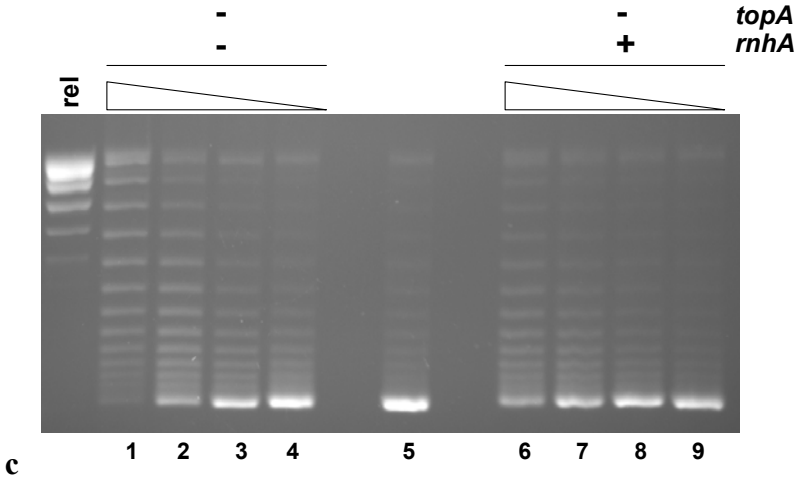
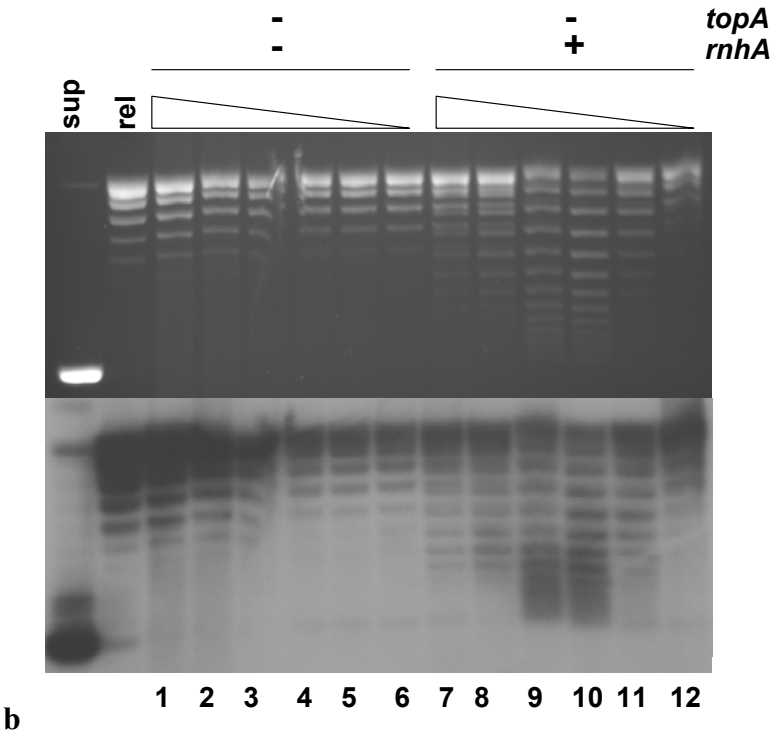
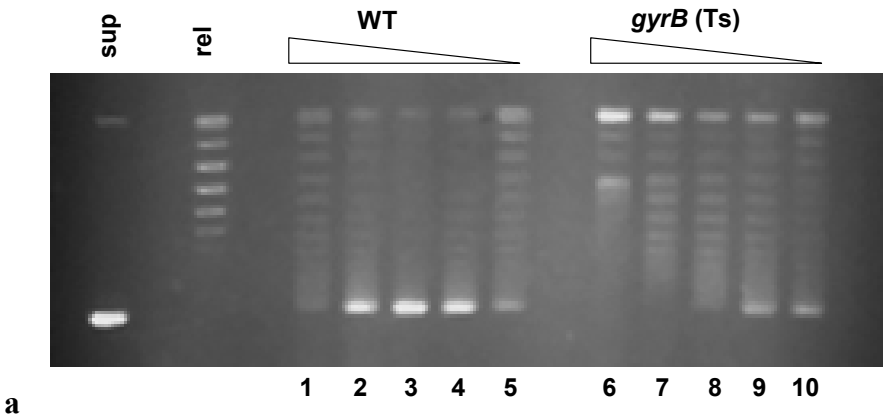


Figure 7. Supercoiling assays in crude cell extracts. Crude cell extracts were prepared and used for supercoiling assays as described in Experimental procedures. In (a), the amounts of protein used in the assays were 28 μg (lanes 1 and 6), 14 μg (lanes 2 and 7), 7 μg (lanes 3 and 8), 3.5 μg (lanes 4 and 9) and 1.75 μg (lanes 5 and 10). The reactions were incubated at 30°C for 2 hours. sup is supercoiled pBR322 and rel is relaxed pBR322. WT and *gyrB*(Ts) respectively indicate AQ634 and MA249 strains that were used in the experiment. In (b), the amounts of protein used in the assays were 40 μg (lanes 1 and 7), 20 μg (lanes 2 and 8), 10 μg (lanes 3 and 9), 5 μg (lanes 4 and 10), 2.5 μg (lanes 5 and 11) and 1.25 μg (lanes 6 and 12). The reactions were incubated at 30°C for 4 hours with twice the amount of ATP. At the top of the ethidium bromide stained gel (top panel), sup is supercoiled pBR322 and rel is relaxed pBR322. The bottom panel is a picture of the gel probed with a random prime-labelled fragment hybridizing to the *bla* gene of pBR322. The strains used in the experiment were PS151 (*topA*⁻, *rnhA*⁻/ pGB2nusB::kan and pBAD18*rnhA*) and PS152 (*topA*⁻, *rnhA*⁺/ pGB2nusB::kan). They were grown in the absence of arabinose and the log phase cultures were obtained from the overnight ones diluted 1:1000. In (c), 2.5 μg of proteins from a crude cell extract of the wild-type strain (AQ634) were mixed with 0, (lane 5), 5 (lane 1), 2.5 (lane 2), 1.25 (lane 3) or 0.63 μg (lane 4) of proteins from the crude extract of PS151 strain used in (b) and with 5 (lane 6), 2.5 (lane 7), 1.25 (lane 8) and 0.63 μg (lane 9) of proteins from the crude extract of PS152 strain used in (b). The reactions were incubated at 30°C for 2 hours. sup is supercoiled pBR322 and rel is relaxed pBR322.

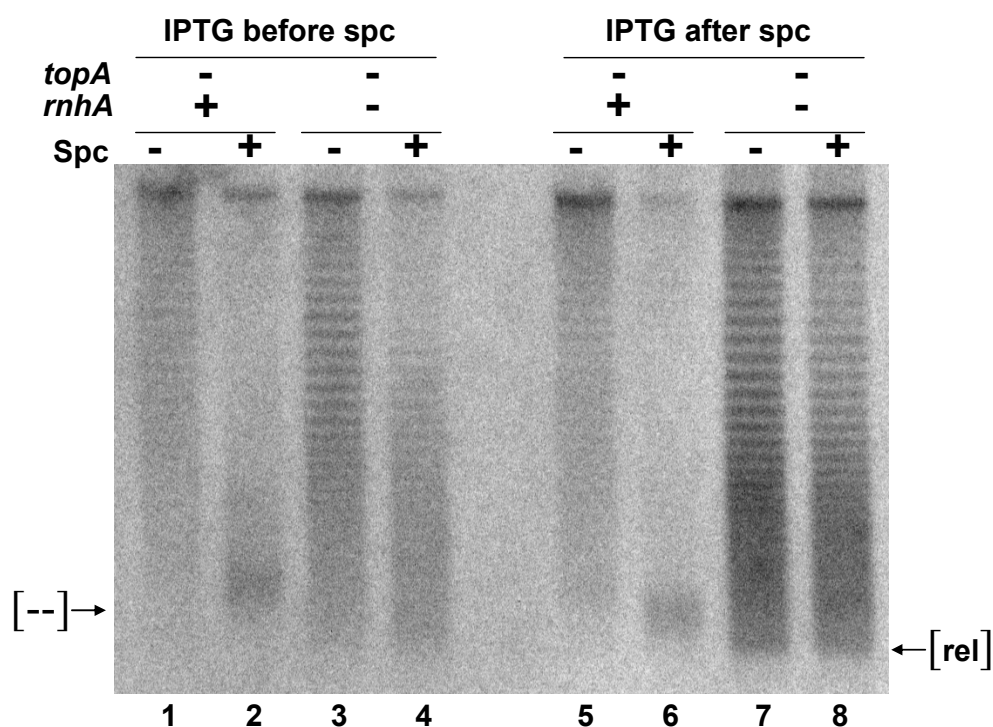


Figure 8. Topoisomerase III overproduction does not change supercoiling in a *topA rnhA* null double mutant. SB224 (*topA*⁻, *rnhA*⁺/ pPH1243) and SB383 (*topA*⁻, *rnhA*⁻/pPH1243) cells were grown in LB to log phase at 37°C. Spectinomycin was added to 400 µg/ml 15 min before the temperature downshift to 28°C. IPTG before spc means that IPTG was added to 1 mM during the growth at 37 °C whereas IPTG after spc means that IPTG was added to 1 mM 5 min after the temperature downshift. DNA was extracted 60 min after the downshift and used for 1-D (7.5 µg/ml chloroquine) gel analysis. The gel was hybridized with a probe to detect pPH1243. [---] points to hypernegatively supercoiled DNA. [rel] indicates extensively relaxed DNA.

Fig 9a

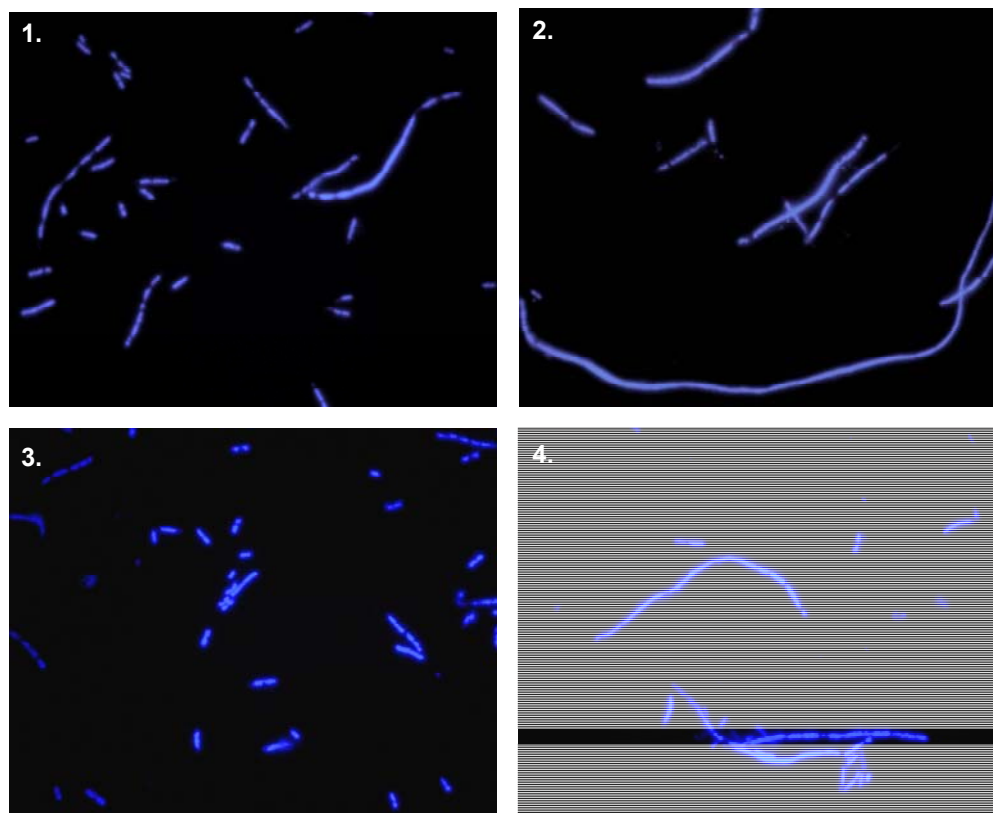


Fig 9b

topA rnhA null mutant/pPH1243

- ITPG

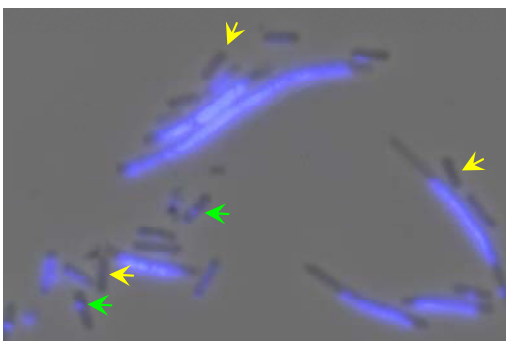


Fig 9c

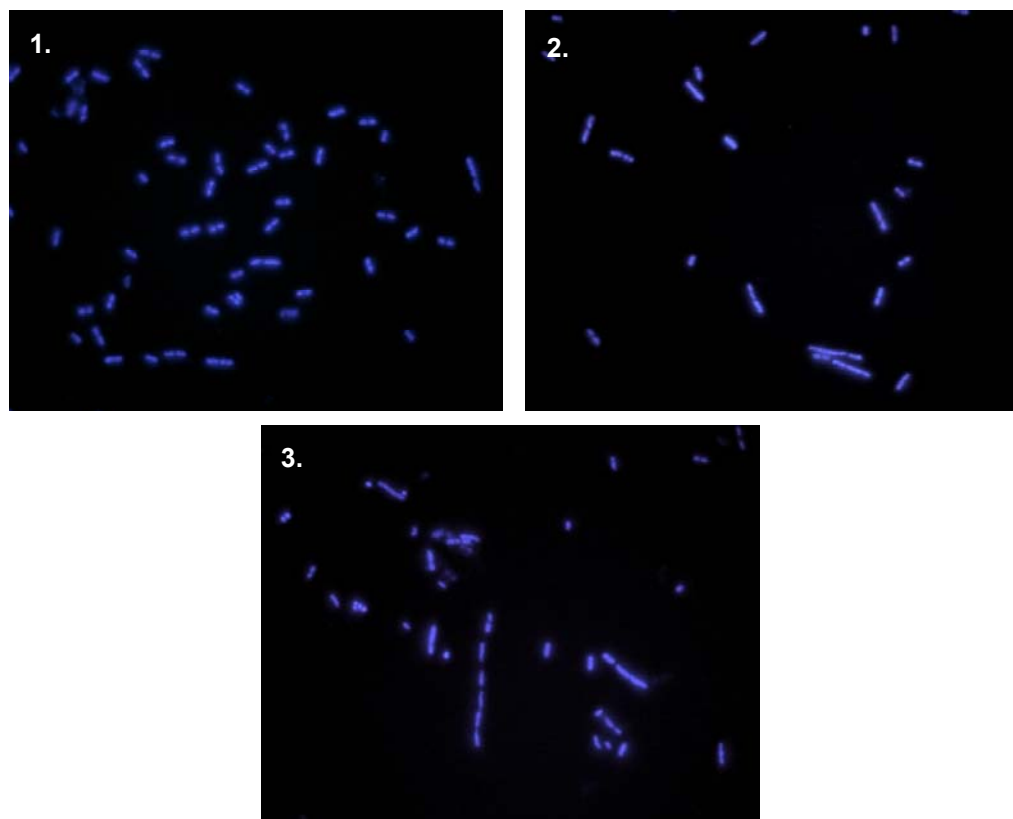


Figure 9. DAPI staining of *topA rnhA* null mutants reveals segregation defects that are corrected by topoisomerase III overproduction. Cells were grown and prepared for microscopy as described in Experimental procedures. In a), 1 and 2 are fluorescence pictures of DAPI stained SB383 cells (*gyrB*(Ts) Δ *topA rnhA::cam*/pPH1243) respectively grown in the presence and the absence of IPTG both during overnight growth on plates and during growth in liquid. 3 and 4 are fluorescence pictures of DAPI stained PS151 cells (*gyrB*(Ts) *topA20::Tn10 rnhA::cam*/pBAD18*rnhA*) respectively grown in the presence and the absence of arabinose both during overnight growth on plates and during growth in liquid. Superimposed pictures of phase contrast and fluorescence (by using Adobe Photoshop) of DAPI stained SB383 (no IPTG) cells are shown in b). Yellow and green arrows indicate respectively anucleate cells and cells with low DNA content. In c), 1 to 3 are fluorescence pictures of DAPI stained RFM430 (wild-type), PH379 (*rnhA::cam*) and RFM475 (*gyrB*(Ts) Δ *topA*) cells, respectively.

III. Discussion

Notre étude a révélé le rôle majeur de la RNase HI dans la régulation du surenroulement de l'ADN et le mécanisme permettant à l'hypersurenroulement négatif d'inhiber la croissance cellulaire. Nos résultats ont démontré que l'introduction de l'hypersurenroulement négatif via la gyrase chez un mutant *topA⁻gyrB(Ts)* déclenchait la dégradation des ARNs naissants et inhibait la croissance. La surproduction de RNase HI permettait de limiter l'hypersurenroulement négatif, de restaurer la croissance et d'accumuler à nouveau des ARNs pleine longueur. En revanche, l'absence de RNase HI chez un mutant *topA⁻gyrB(Ts)* stimulait une réponse cellulaire capable d'inhiber l'activité de surenroulement de la gyrase et menait à un arrêt de la croissance, à une filamentation des cellules et à l'accumulation de cellules anucléées.

Chez les mutants *topA⁻gyrB(Ts)*, l'accumulation d'hypersurenroulement négatif et l'inhibition de croissance observés à basse température seraient causés par la formation de R-loops en amont du complexe transcriptionnel (Massé et Drolet., 1999a, b, c, Stupina et Wang., 2005). Nous avons déjà proposé un mécanisme de boucle de régulation entre l'hypersurenroulement négatif et les R-loops où leur formation serait mutuellement stimulée via la gyrase et la RNase HI (Drolet., 2006). Les expériences de transcription *in vitro* à partir d'ADN hypersurenroulé négativement ont montré que des R-loops se formaient indépendamment de la séquence nucléotidique (article 1, figure 8). Ces résultats soutiendraient l'hypothèse que des R-loops non-spécifiques seraient abondamment synthétisés durant la transcription *in vivo* chez les mutants *topA⁻gyrB(Ts)*. Nos résultats de transcription *in vitro* nous montrent également que la formation de R-loops non-spécifiques peut survenir durant la transcription de matrices avec des densités de surenroulement plus basses que des matrices hypersurenroulées (Flora Nolent, résultats non publiés. Annexe). La formation de R-loops non-spécifiques pourrait donc survenir lorsque des cellules sont exposées à des stress causant une augmentation de surenroulement de l'ADN.

Comme le montre les résultats *in vivo* présentés à la figure 1A de l'article 1, l'ADN d'un mutant *topA⁻gyrB(Ts)* est hypersurenroulé négativement à 28°C lorsque la RNase HI est exprimée à un niveau basal. Cette accumulation de supertours négatifs corrèle exactement avec une inhibition de la croissance qui reprend dès la résolution de l'hypersurenroulement. La surexpression de la RNase HI à partir d'un plasmide abolit

totale la formation d'hypersurenroulement négatif. L'effet est beaucoup plus spectaculaire à 26°C où l'hypersurenroulement négatif s'accumule de manière excessive (figure 1B, article 1). Contrairement à 28°C, la surexpression de la RNase HI ne permet pas d'éliminer complètement l'ADN hypersurenroulé, et, en conséquence, la croissance est légèrement altérée. Cette incapacité de la RNase HI à éliminer l'hypersurenroulement négatif et à restaurer la croissance est encore plus marquée à 21°C (figure 1C, article 1). Cela pouvait s'expliquer par le fait que la topoisomérase IV (autre topoisomérase capable de relaxer le surenroulement négatif) et/ou la RNase HI seraient moins actives à basses températures (Il semble que la topoisomérase IV soit impliquée dans l'élimination de l'hypersurenroulement négatif puisque l'inhibition de cette dernière via l'ajout de norfloxacine favorise fortement l'accumulation d'ADN hypersurenroulé négativement à température non-permissive (article 2, figure 5).

Il avait été démontré auparavant que les ARNm auraient fortement tendance à être dégradés par les RNases lorsque les ribosomes étaient défectueux (Iost et Dreyfus., 1995) et que la transcription des ARNr était étroitement liée à l'assemblage des ribosomes (Lewicki et *al.*, 1993). Or, la synthèse des ARNr chez les mutants *topA⁻gyrB(Ts)* était défectueuse (Hraiky et *al.*, 2000). Il était donc intéressant de vérifier si la dégradation des ARNs dans les mutants *topA⁻gyrB(Ts)* pouvait être liée à la présence de ribosomes défectueux. Pour cela, des expériences de traduction *in vitro* avaient été réalisées en utilisant des ribosomes extraits à 28°C d'une souche *topA⁻gyrB(Ts)* versus une souche *gyrB(Ts)*. On y ajoutait soit des ARNm (issus du phage MS2) possédant un site d'initiation de la traduction et permettant de valider la capacité des ribosomes à initier la traduction, soit des ARNs polyU permettant de vérifier la capacité des ribosomes à faire l'élongation. Aucune différence n'avait été notée entre les ribosomes extraits de la souche *topA⁻gyrB(Ts)* et ceux extraits de la souche *gyrB(Ts)* signifiant que les ribosomes de la souche *topA⁻gyrB(Ts)* étaient tout à fait capables d'initier la traduction et de procéder correctement à l'élongation (données non montrées).

L'isolation des ribosomes et de leurs ARNm montrait aussi une accumulation de petits ARNm. Dans l'article 1, figure 2 et 3, on observait l'accumulation de monosomes associés à des ARNm tronqués de *yhdG* et *fis* pour le mutant *topA⁻gyrB(Ts)*. Quand aux mutants *gyrB(Ts)* et *topA⁻gyrB(Ts)* qui surproduisaient la RNase HI, nous observions un

mélange de monosomes et de polysomes associés à des ARNm pleine longueur. Finalement, le nombre de ribosomes fixés était proportionnel à la taille de l'ARNm qui devait être traduit. Ces ARNs tronqués étaient tous traductibles puisqu'ils étaient associés aux ribosomes. L'ajout de L-[³⁵S]cystéine à 28°C dans les cultures de mutants *gyrB(Ts)*, *topA⁻gyrB(Ts)* et des mutants *topA⁻gyrB(Ts)* capables de surproduire la RNase HI avait permis de mesurer la synthèse protéique. Comme nous le savons, les cellules ont naturellement la capacité de conserver les protéines entières, fonctionnelles et de détruire les autres. Cette technique avait donc pour avantage de ne marquer que les protéines à faible poids moléculaire intactes. Nous observions à la figure 4A du 1^{er} article, que le mutant *topA⁻gyrB(Ts)* accumulait intensivement des petites protéines contrairement aux 2 autres mutants (le simple mutant *gyrB(Ts)* et le mutant *topA⁻gyrB(Ts)* capable de surproduire la RNase HI). En effet, le ratio grosse protéine/petite protéine était nettement plus bas (article 1, figure 4B).

Chez les mutants *topA⁻gyrB(Ts)*, nous avons déjà observé l'accumulation d'ARNm tronqués de *crp* et de *yhdG* et *fis* (issus de l'opéron *yhdG-fis*) à basse température (Baaklini et al., 2004). À l'aide de sondes s'hybridant aux extrémités 5' des ARNs, nous avons précédemment testé l'hypothèse que la transcription chez les mutants *topA⁻gyrB(TS)* pouvait être inhibée par la présence de R-loops bloquant la progression des ARN polymérases (Baaklini et al., 2004). Nous avons pu vérifier ici à l'aide de sondes 3' que les ARNs étaient synthétisés correctement puis rapidement dégradés. Les figures 5 et 6 du 1^{er} article montrent effectivement que durant la croissance du mutant *topA⁻gyrB(Ts)* à 28°C, la maturation des ARNs était fortement altérée et que ces derniers étaient rapidement dégradés, contrairement au mutant *topA⁻gyrB(Ts)* capable de surproduire la RNase HI. Ces résultats démontraient clairement que l'incapacité à accumuler des ARNs pleine longueur n'était pas liée à des problèmes de synthèse mais plutôt à des problèmes de maturation et de dégradation. Finalement, l'excès d'ARNm incomplets aboutirait naturellement à un excès de protéines non fonctionnelles et donc à une inhibition de la croissance cellulaire.

Pour comprendre les causes de la dégradation des ARNs, nous avons testé l'implication de la RNase E, la principale RNase impliquée dans la dégradation des ARNs chez *E. coli* (Kushner., 2002), ainsi que la nécessité d'induire la synthèse *de novo*

d'une RNase. Chez une cellule *gyrB(Ts)* contenant l'opéron *lac* sous contrôle du promoteur *P_{trc}*, l'inhibition de la RNase E à 28°C induit légèrement l'accumulation de *lacA* normal. Chez une cellule *topA⁻gyrB(Ts)*, l'inhibition de la RNase E induit l'accumulation des produits de dégradation de *lacA*, mais pas de *lacA* normal (article 1, figure 7). Ces résultats indiquaient donc que la RNase E n'était pas impliquée dans la dégradation des ARNs chez les mutants *topA⁻gyrB(Ts)*. L'ajout de spectinomycine (un inhibiteur de la synthèse protéique) a permis de conclure que la dégradation des ARNs n'impliquait pas la synthèse *de novo* de nouvelles RNases, signifiant qu'une ou des RNase(s) (autre que la RNase E) déjà existante(s) serai(en)t elle(s)-même(s) responsable(s) de cette dégradation.

Tous ces résultats suggéraient fortement l'implication directe des R-loops dans l'accumulation d'hypersurenroulement négatif et dans l'inhibition de la croissance des mutants *topA⁻gyrB(Ts)*. Ainsi, nous supposons que l'hypersurenroulement négatif mènerait à la formation de R-loops non spécifiques. Les ARNm impliqués dans ces structures seraient rapidement dégradés par la RNase HI expliquant ainsi l'inhibition de la croissance et l'incapacité de ces mutants à accumuler des ARNs pleine longueur

Il n'est pas facile d'expliquer l'action paradoxale de la RNase HI puisqu'un niveau basal de RNase HI inhibe la synthèse protéique et la croissance tandis que sa surproduction restaure ces phénotypes. Une possibilité serait que l'expression à un niveau sauvage de la RNase HI ne permettrait pas d'abolir et de prévenir assez rapidement la formation d'hypersurenroulement négatif qui deviendrait la cible d'un mécanisme encore inconnu menant à la dégradation des ARNs. La topoisomérase IV, saturée, serait alors incapable de relaxer suffisamment l'excès de supertours négatifs menant à l'accumulation d'ARNs tronqués. On ne peut exclure également que les R-loops représentent une barrière physique pour les prochaines ARN polymérases. Nous avons également supposé l'intervention d'un système toxine-antitoxines. Les systèmes toxine-antitoxines (TA) comme MazEF (Aizenman et *al.*, 1996, Zhang et *al.*, 2003) et ChpBIK (Masuda et Ohtsubo., 1994, Zhang et *al.*, 2005) intervenants dans la mort cellulaire programmée chez *Escherichia coli*, sont fréquents dans la plupart des génomes bactériens séquencés à ce jour. Ces systèmes codent pour une toxine stable (une endoribonucléase) et une antitoxine qui inhibe l'effet de la toxine en formant un complexe avec celle-ci.

L'antitoxine est instable suite à sa dégradation par des protéases ATP-dépendantes. Afin de maintenir un ratio antitoxine/toxine constant dans des conditions normales de croissance, l'expression des systèmes TA est régulée négativement au niveau transcriptionnel par le complexe toxine-antitoxine lui-même. Néanmoins, cette hypothèse avait été finalement rejetée puisque nous avons quand même observé une dégradation massive des ARNs après l'ajout d'un inhibiteur de la synthèse protéique (la spectinomycine) avant le transfert des mutants *topA⁻gyrB(Ts)* à 28°C. Il était donc peu probable que l'hypersurenroulement négatif stimule la dégradation des ARNs via la formation *de novo* d'une endoribonucléase.

Afin de mieux comprendre l'implication de la RNase HI dans la topologie de l'ADN chez les mutants *topA⁻gyrB(Ts)*, nous avons décidé de construire un mutant *topA⁻gyrB(TS)rnhA⁻*. Il s'est avéré que les mutations *topA⁻* et *rnhA⁻* ne pouvaient cohabiter ensemble que si la RNase HI ou la topoisomérase III étaient surexprimées à partir d'un plasmide. Lorsque la mutation *rnhA⁻* était transduite chez un mutant *topA⁻*, les cellules obtenues poussaient très lentement et filaient signifiant que la cohabitation des deux mutations n'était pas bactéricide mais plutôt bactériostatique.

Contre toute attente, les expériences de mesure du surenroulement ont montré que la déplétion de RNase HI à 28°C dans un mutant *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* capable de surproduire la RNase HI menait à une relaxation extensive de l'ADN accompagnant l'inhibition de croissance. A la figure 1A du 2^{ème} article, nous pouvions observer suite au transfert à 28°C du double mutant *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻*, la formation d'ADN relaxé quand la RNase HI n'était pas surproduite (article 2, figure 1A, ligne 4) contrairement à un simple mutant *topA⁻gyrB(Ts)* où l'hypersurenroulement négatif s'accumulait (figure 1A, ligne 2). Comme il était relativement difficile de distinguer l'hypersurenroulement négatif de l'ADN relaxé sur un gel de chloroquine à 1 dimension, puisque ceux-ci migrent à peu près à la même distance, la résolution en 2 dimensions a permis de confirmer que l'ADN était bien relaxé (article 2, figure 1B).

L'observation des mutants *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* au microscope après une coloration au DAPI, révélait que la déplétion de RNase HI causait la filamentation des cellules, la présence de nucléoïdes anormaux et un défaut de ségrégation (article 2, figure

9B). Ces premiers résultats indiquaient clairement que les R-loops étaient responsables de tous les problèmes phénotypiques des mutants *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻*.

Il avait été démontré que les R-loops pouvaient constituer des cibles importantes pour la topoisomérase III (Broccoli et al., 2000). Cette enzyme pouvait également, sous certaines conditions, participer à la ségrégation des chromosomes au moment de la réplication (Lopez et al., 2005). Les résultats de la figure 4A et 4B du 2^{ème} article, montraient d'une part que la surproduction de topoisomérase III chez le mutant *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* restaurait la croissance sur pétri; que les problèmes de filamentation et de mauvaise répartition de l'ADN étaient résolus (figure 9B) tandis que les expériences de surenroulement à la figure 8 montraient que le surenroulement demeurait toujours relaxé. Ces résultats pouvaient laisser croire que le problème de ségrégation des chromosomes des mutants *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* seraient dus à une sur-réplication spécifiquement à *oriK* (cSDR) causant des collisions des fourches de réplication et des cassures doubles brins (Kouzminova et al., 2004, Simmons et al., 2004, Michel et al., 2007), l'accumulation d'intermédiaires de recombinaison et donc des problèmes d'hyper-recombinaison (Zahradka et al., 1999). La topoisomérase III est présente seulement à environ 10 copies par cellule (DiGate et Mariani., 1989). Cette sur-réplication pourrait donc saturer la capacité de la topoisomérase III à faire la décaténation et empêcherait donc la cellule d'effectuer une ségrégation adéquate des chromosomes. Cette dernière serait également dépassée par l'excès d'intermédiaires de recombinaison (Zhu et al., 2001, Lopez et al., 2005). Ces résultats justifieraient le fait que la surexpression de la topoisomérase III rétablirait une bonne ségrégation des chromosomes. De plus, en ciblant l'ADN simple brin présent dans les R-loops, la topoisomérase III pourrait les déstabiliser.

La topoisomérase IV est connue pour être capable de relaxer les supertours négatifs (Zechiedrich et al., 1997) et on ne pouvait exclure la possibilité que cette dernière puisse être à l'origine de cette relaxation. On s'attendait donc à voir sa concentration plus élevée chez le mutant *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻*. Le western blot présenté à la figure 3 du 2^{ème} article montrait qu'il n'y avait aucune différence claire entre d'une part les mutants *topA⁻gyrB(Ts)* versus les mutants *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* ni même quand la RNase HI ou la topoisomérase III étaient surproduites. De plus, des expériences *in vivo* avaient été réalisées avec le mutant *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* contenant l'allèle *gyrA* résistante

à la norfloxacine afin de savoir si la topoisomérase IV (sensible à la norfloxacine) était responsable de la relaxation. Aucune stimulation du surenroulement n'était observée contrairement au simple mutant *topA⁻gyrB(Ts)* (article 2, figure 5). Ces résultats indiquaient clairement que la topoisomérase IV n'était donc pas responsable de la relaxation extensive de l'ADN chez le mutant *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻*.

En somme, toutes les expériences réalisées sur le mutant *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* pour trouver l'origine de cette relaxation, nous indiquaient clairement qu'elle serait due à l'incapacité de la gyrase à introduire des supertours négatifs. En effet, comme vu auparavant, l'hypersurenroulement était généré en absence de topoisomérase I par l'accumulation de supertours négatifs via la gyrase (Massé et Drolet., 1999c). Cependant, la gyrase est également connue pour introduire des supertours négatifs en présence d'ATP et pour relaxer en son absence. Il semblerait donc que l'inhibition de la RNase HI et donc la présence de R-loops stables déclencheraient une réponse cellulaire capable de cibler la gyrase et d'empêcher cette dernière d'introduire des supertours négatifs.

Chez un simple mutant *rnha⁻*, nous observions déjà une relaxation de l'ADN lorsque les cellules poussaient à 37°C en présence de spectinomycine (Usongo et *al.*, résultats non-publiés). La relaxation pourrait d'un côté être causée directement ou indirectement par un facteur empêchant la gyrase d'introduire du surenroulement négatif ou bien par un facteur qui stimulerait son activité de relaxation. Il est important de signaler qu'il n'y a aucune différence significative d'expression de la gyrase entre un mutant *topA⁻gyrB(Ts)* et un mutant *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* même si on surexprime la topoisomérase III ou la RNase HI (article 2, figure 3) ce qui aurait pu expliquer la relaxation observée.

Afin de savoir s'il existait effectivement un ou plusieurs facteurs inhibant l'activité de surenroulement de la gyrase, des expériences de surenroulement ont été réalisées à partir d'extraits protéiques issus de plusieurs souches (sauvage, *gyrB(Ts)*, *topA⁻gyrB(Ts)*, *topA⁻gyrB(TS)rnhA⁻*). A la figure 7A du 2^{ème} article, nous pouvions simplement observer que la gyrase contenue dans l'extrait protéique de la souche sauvage était naturellement capable d'introduire des supertours négatifs tout comme la souche *gyrB(Ts)* bien que cette dernière soit moins efficace. A la figure 7B, nous pouvions clairement observer que la gyrase contenue dans l'extrait protéique du mutant *topA⁻*

gyrB(Ts)rnhA⁻ restait inhibée puisque l'ADN restait relaxé. Le mélange de l'extrait protéique d'une souche sauvage à des dilutions successives de l'extrait protéique du mutant *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* a clairement montré que l'activité de surenroulement de la gyrase sauvage était inhibée par un ou plusieurs facteurs contenus dans l'extrait protéique de la souche *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* (figure 7C).

A la vue de tous ces résultats, plusieurs hypothèses avaient été mises en avant pour identifier ces facteurs et expliquer l'incapacité de la gyrase à introduire des supertours négatifs chez le mutant *topA⁻gyrB(Ts) rn hA⁻* : la possibilité d'une interaction directe avec un inhibiteur de la gyrase comme GyrI et Muri, qui empêche l'ADN de s'accrocher à la gyrase (Baquero et al., 1995, Oh et al., 2001), une altération de la concentration cellulaire des protéines de type histone comme HU et Fis (Travers et Muskhelishvili et al., 2005 a, b), la présence d'un facteur pouvant consommer l'ATP au détriment de la gyrase.

Tout d'abord il semblerait que ce facteur soit bien de nature protéique puisque le chauffage d'extraits protéiques issus d'un mutant *topA⁻gyrB(Ts) rn hA⁻* permettait de lever totalement l'inhibition de la gyrase. Celle-ci était à nouveau capable de surenrouler contrairement à l'extrait non chauffé (Usongo., résultats non-publiés).

L'hypothèse de l'action d'inhibiteurs comme GyrI et Muri

Il avait déjà été prouvé que l'absence de RNase HI causait une expression constitutive du régulon SOS comparativement à une cellule sauvage (Kogoma., 1994; McCool et al., 2004). Or, chez *Escherichia coli*, il avait été aussi montré que GyrI, un inhibiteur de la gyrase codé par le gène *sbmC*, faisait partie des régulons SOS et RpoS (Baquero et al., 1995, Nakanishi et al., 1998, Chatterji et Nagaraja., 2002). L'inhibiteur GyrI agirait en empêchant l'interaction de la gyrase avec l'ADN (Chatterji et Nagaraja., 2002, Chatterji et al., 2003). Nos résultats sur puce à ADN n'avaient pas montré une surexpression de GyrI dans les mutants *rnhA⁻* et *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* (résultats non-publiés). De plus, l'expérience de surenroulement (article 2, figure 6) où *sbmC* avaient été délétés dans les souches *topA⁻gyrB(Ts)* et *topA⁻gyrB(TS)rnhA⁻* a montré qu'à 28°C, l'ADN redevenait hypersurenroulé négativement pour le mutant *topA⁻gyrB(Ts)* (ligne 6) alors qu'il restait relaxé pour la souche *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* (ligne 5). Ce résultat indiquait

clairement que GyrI n'était pas responsable de la relaxation puisque son absence ne permettait pas de rétablir le surenroulement chez la souche *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻*.

Un autre inhibiteur de la gyrase, MurI (racémase glutamate), est connu pour être exprimer durant la phase de formation du peptidoglycane et pour catalyser la conversion du L-glutamate en D-glutamate, qui est un acide aminé essentiel dans la formation du peptidoglycane (Doublet et *al.*, 1992, Doublet et *al.*, 1993, Dougherty et *al.*, 1993). En plus de cette fonction, MurI était désormais connu pour inhiber également la gyrase mais seulement en présence de précurseur du peptidoglycane UDP-MurNAc-L-Ala, qui joue le rôle d'activateur (Ashiuchi et *al.*, 2002). Tout comme GyrI, il semblerait que c'est en empêchant la fixation de la gyrase à l'ADN que MurI inhiberait cette dernière (Sengupta et Nagaraja, 2008, Sengupta et *al.*, 2006). Il a aussi été démontré chez *E. coli*, que l'absence de MurI conduisait à la formation de longs filaments (Doublet et *al.*, 1992) tandis que sa surexpression induisait plusieurs changements cellulaires comme une mauvaise séparation des nucléoïdes et l'inhibition de la croissance (Balikó et Venetianer., 1993). Finalement, des northern blots avaient été réalisés à partir d'ARNs extraits de mutants *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻*. Les résultats n'ont montré aucune surexpression de MurI dans ces cellules indiquant clairement que tout comme GyrI, MurI n'était lui non plus responsable de l'inhibition de la gyrase (Usongo., résultats non publiés).

L'hypothèse d'une altération de la concentration cellulaire de protéines de type « histone »

Comme nous le savons, le chromosome bactérien est associé à des protéines de type histones qui participent à la compaction comme HU, Fis...

La protéine HU est la plus abondante (50 000 en phase exponentielle (Azam et Ishihama., 1999)) et il a été démontré qu'il existait une relation étroite entre la protéine HU, le niveau de surenroulement et la gyrase. En effet, des études préliminaires avaient tout d'abord montré que HU stimulait l'activité de la gyrase *in vitro* (Marians., 1987). Son absence de la cellule menait à un ralentissement de la croissance et à une relaxation partielle du chromosome bactérien et de plasmide (Hillyard et *al.*, 1990, Malik et *al.*, 1996, Ogata et *al.*, 1997). Ce phénotype était restauré par des mutations dans le gène *gyrB* (Malik et *al.*, 1996). Cette augmentation de surenroulement semblait clairement être

attribuée à la gyrase puisque l'activité de la topoisomérase I n'était pas diminuée (Bensaid et *al.*, 1996). Finalement, nous avons supposé qu'une pénurie de HU pouvait justifier la relaxation observée chez le mutant *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻*. Des northern blot avaient été réalisés pour l'ARN des souches *topA⁻gyrB(Ts)* et *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻*. Il s'est avéré qu'aucune différence d'expression de HU n'avait été observée.

En ce qui concerne la protéine Fis, il était clairement établi qu'elle exerçait un contrôle de la transcription des gènes codant pour les topoisomérases et notamment la gyrase (Schneider et *al.*, 1999, Schneider et *al.*, 2000). De plus Fis peut directement affecter l'activité de surenroulement de la gyrase (Schneider et *al.*, 1997). Des expériences de western blot réalisées à partir des protéines extraites des souches sauvage, *topA⁻gyrB(Ts)* et *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* n'ont montré aucune différence entre ces souches. Ces résultats indiquaient donc que Fis n'était pas surreprésentée dans la souche *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* et qu'elle ne pouvait donc être responsable de la relaxation en absence de RNase HI.

De plus, nos résultats obtenus sur l'expression des autres protéines de types histone (H-NS, StpA, IHF) via une puce à ADN n'a pas montré de variations dans leur expression (Usongo et *al.*, résultats non publiés).

L'hypothèse d'un facteur capable d'utiliser l'ATP au détriment de la gyrase

Comme mentionné auparavant, l'activité de surenroulement de la gyrase est fortement affectée par le ratio ATP/ADP. Nous avons donc supposé que l'absence de RNase HI pouvait stimuler l'expression d'une protéine qui consommerait l'ATP à la place de la gyrase. Pour cela, des expériences *in vitro* permettant de mesurer l'activité de surenroulement de la gyrase à partir d'extraits protéiques issus des souches *topA⁻gyrB(Ts)* et *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* avaient été réalisées en utilisant des concentrations croissantes d'ATP. Les résultats avaient montré une stimulation semblable de l'activité de surenroulement de la gyrase pour les mutants *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* et *topA⁻gyrB(Ts)* (Usongo., résultats non publiés). Ces résultats semblaient clairement indiquer que l'inhibition de la gyrase n'était pas due à la présence d'un facteur intracellulaire capable d'utiliser l'ATP au détriment de la gyrase. En effet, si cela avait été le cas, nous n'aurions pas vu une augmentation de l'activité de la gyrase pour le mutant *topA⁻gyrB(Ts)*.

Conclusion

En résumé, nous avons pu clairement prouver que l'inhibition de la croissance observée à 28°C chez les mutants *topA⁻gyrB(Ts)* capable d'exprimer la RNase HI à un niveau basal, avait pour origine l'accumulation d'ARNs tronqués. Cette dégradation était également associée à l'accumulation de supertours négatifs durant la transcription via la gyrase. La surexpression de RNase HI restaurait les phénotypes indiquant que l'inhibition de la synthèse protéique était liée à la formation de R-loops et à l'accumulation d'hypersurenroulement négatif. Étonnement, la déplétion de la RNase HI dans le mutant *topA⁻gyrB(Ts)* ne permettait pas de restaurer le surenroulement ni l'inhibition de la croissance mais causait bien au contraire une relaxation extrême, un arrêt de la croissance, la filamentation des cellules, une augmentation de cellules anucléées et une répartition incorrecte des nucléoïdes. La surproduction de la topoisomérase III ne permettait de rétablir que la croissance et la distribution de l'ADN dans les cellules sans rétablir le surenroulement tandis que la surproduction de la RNase HI permettait de tout restaurer. Il semblait donc que l'excès de R-loops lié à l'absence de RNase HI chez un mutant *topA⁻gyrB(Ts)* déclencherait une riposte cellulaire rendant la gyrase inapte à introduire des supertours négatifs. La déplétion de RNase HI déclencherait donc l'activation ou la synthèse d'un ou plusieurs facteurs protéiques intracellulaires spécifiques de la gyrase. Comme il avait été démontré, l'absence de RNase HI chez *Escherichia coli* provoquait l'accumulation de R-loops pouvant stopper la progression de fourches de réplifications et causer des dommages à l'ADN. Cela aurait pour conséquence d'induire la réponse SOS (Kogoma et *al.*, 1993). Il était donc possible que l'expression de ces facteurs soit induite par la réponse SOS. Cependant, l'introduction d'une mutation *lexA3* dans la souche *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* l'empêchant ainsi d'induire la réponse SOS, ne permettait pas de restaurer le surenroulement (Usongo et *al.*, 2008).

Finalement, plusieurs voies restent encore à être investiguées : une interaction directe avec une molécule analogue à l'ATP pourrait également inhiber sa fixation à la gyrase en jouant le rôle de compétiteur (comme des protéines de type coumarins et cyclothialidines) (Oblak et *al.*, 2007). On peut supposer également que la voie métabolique de synthèse de l'ATP chez le mutant *topA⁻gyrB(Ts) rnhA⁻* puisse être altérée (Westerhoff et *al.*, 1988, Drlica., 1992). Il se peut aussi qu'il existe une tension excessive

sur l'ADN causée par une protéine comme la protéine membranaire SetB (Espeli et *al.*, 2003) qui, si elle est surproduite, pourrait stimuler la relaxation par la gyrase (Nöllmann et *al.*, 2007).

Concernant la possibilité de tensions extrêmes sur l'ADN via une protéine comme SetB, nous pourrions étudier 2 souches *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* dont l'une serait incapable d'exprimer *setB* et faire des expériences de surenroulement de l'ADN sur gel de chloroquine afin d'observer ou non une correction du surenroulement. La surproduction de SetB pourrait rétablir la relaxation de l'ADN. Nous pourrions également étudier le niveau d'expression de SetB par northern blot ou PCR en temps réel et/ou analyser le niveau de SetB par western blot. Ces études pourraient s'accompagner d'observation au microscope de la répartition de l'ADN dans les cellules et de la forme des cellules.

Il reste également la possibilité d'une modification de la voie métabolique de la synthèse d'ATP intracellulaire. Chez les procaryotes, la synthèse de l'ATP se fait dans le cytoplasme via le cycle de Krebs et la glycolyse. Il serait intéressant de savoir si un mutant *rnhA⁻* serait capable de dévier en partie la progression de certains cycles afin de limiter la production d'ATP. Pour cela, nous devrions au préalable étudier chez le mutant *topA⁻gyrB(Ts)rnhA⁻* versus une souche sauvage, *gyrB(Ts)*, *topA⁻gyrB(Ts)* et *rnhA⁻* l'expression de tous les gènes impliqués dans ces 2 voies de biosynthèses grâce à une puce ADN. D'autres expériences seraient ensuite réalisées afin de mieux comprendre leur implication dans la synthèse de l'ATP et donc les conséquences sur l'activité de surenroulement de la gyrase.

La production d'un inhibiteur naturel de la gyrase due à l'absence de RNase HI qui compétitionnerait l'ATP serait possible. Il faudrait dans ce cas pouvoir purifier cet inhibiteur en réalisant une co-immunoprécipitation du complexe gyrase-inhibiteur mais il faudrait que l'interaction entre la gyrase et son inhibiteur soit stable dans les conditions expérimentales.

Nous pourrions également mesurer la consommation d'ATP par la gyrase. Pour effectuer ce type de dosage, on procèderait à la technique utilisant la luciférase de luciole. Le dosage de l'ATP repose sur la mesure de l'intensité de l'émission lumineuse qui sera proportionnelle à la quantité d'ATP dans le milieu.

Il nous reste clairement beaucoup de travail à faire sur l'identification du rôle majeur de la RNase HI et des R-loops sur la topologie de l'ADN et donc l'expression génique. L'identification d'un inhibiteur inconnu de la gyrase ou bien d'un mécanisme indirect capable de réguler son activité serait également une découverte fondamentale, considérant également que la gyrase est la cible de plusieurs antibiotiques.

IV. Références bibliographiques

Adams, D. E., Shekhtman, E. M., Zechiedrich, E. L., Schmid, M. B. & Cozzarelli, N. R. (1992). The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell*, **71**, 277-88.

Aguilera, A., & Klein, H. L. (1990). HPR1, a novel yeast gene that prevents intrachromosomal excision recombination, shows carboxy-terminal homology to the *Saccharomyces cerevisiae* *TOP1* gene. *Mol Cell Biol*; **10**, 1439-51

Aguilera, A. (2005). mRNA processing and genomic instability. *Nat Struct Mol Biol*; **12**, 737-8.

Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., & Glaser, G. (1996) An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by guanosine [corrected] 3', 5'-bispyrophosphate : a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*; **93**, 6059-63.

Ali Azam, T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., Ishihama, A. (1999). Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J Bacteriol*; **181**, 6361-70.

Arudchandran, A., Cerritelli, S., Narimatsu, S., Itaya, M., Shin, D. Y., Shimada, Y., Crouch, R. J. (2000). The absence of ribonuclease H1 or H2 alters the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to hydroxyurea, caffeine and ethyl methanesulphonate: implications for roles of RNases H in DNA replication and repair. *Genes Cells*; **5**, 789-802.

Ashiuchi, M., Kuwana, E., Yamamoto, T., Komatsu, K., Soda, K & Misono, H. (2002) Glutamate racemase is an endogenous DNA gyrase inhibitor. *J Biol Chem*; **277**, 39070-3.

Azam, T. A., & Ishihama, A. (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J Biol Chem*; **274**, 33105-13.

Baaklini, I., Usongo, V., Nolent, F., Sanscartier, P., Hraiky, C., Drlica, K., & Drolet, M. (2008) Hypernegative supercoiling inhibits growth by causing RNA degradation. *J Bacteriol*; **190**, 7346-56.

Baaklini, I., Hraiky, C., Rallu, F., Tse-Dinh, Y. C., & Drolet, M. (2004) RNase HI overproduction is required for efficient full-length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*; **54**, 198-211.

Balikó, G., & Venetianer, P. (1993) An *Escherichia coli* gene in search of a function: phenotypic effects of the gene recently identified as *murI*. *J Bacteriol*; **175**, 6571-7.

Baquero, M. R; Bouzon, M; Varea, J., & Moreno, F. (1995) *sbmC*, a stationary-phase induced SOS *Escherichia coli* gene, whose product protects cells from the DNA replication inhibitor microcin B17. *Mol Microbiol*; **18**, 301-11.

Basu, U; Chaudhuri, J; Phan, R.T; Datta, A., & Alt, W. (2007) Regulation of activation induced deaminase via phosphorylation. *Adv Exp Med Biol*; **596**, 129-37.

Bauer, W. R; Crick, F. H., & White, J. H. (1980) Supercoiled DNA. *Sci am*; **243**, 100-13.

Bensaid, A; Almeida, A; Drlica, K., & Rouviere-Yaniv, J. (1996) Cross-talk between topoisomerase I and HU in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*; **256**, 292-300.

Berger, J. M. (1998) Structure of DNA topoisomerases. *Biochim Biophys Acta*; **1400**, 3-18.

Berger, J. M., Gamblin, S. J., Harrison, S. C., & Wang, J. C. (1996). Structure and mechanism of DNA topoisomérase II. *Nature*; **379**, 225-32. Erratum in: *Nature* 1996 Mar 14;380(6570):179

Bergerat, A., de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P. C., Nicolas, A., & Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature*, **386**, 414-417.

Bergerat, A., Gadelle, D., & Forterre P. (1994). Purification of a DNA topoisomerase II from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*. A thermostable enzyme with both bacterial and eucaryal features. *J Biol Chem*, **269**, 27663-27669.

Bétermier, M., Galas, D. J., & Chandler, M. (1994). Interaction of Fis protein with DNA: bending and specificity of binding. *Biochimie*, **76**, 958-67.

Bliska, J. B. & Cozzarelli, N. R (1987) Use of site-specific recombination as a probe of DNA structure and metabolism *in vivo*. *J. Mol. Biol*, **194**, 205-218.

Blot, N., Mavathur, R., Geertz, M., Travers, A., & Muskhelishvili, G. (2006) Homeostatic regulation of supercoiling sensitivity coordinates transcription of the bacterial genome. *EMBO Rep*;7, 710-5.

Bogenhagen, D., & Clayton D. A. (1978) Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells : kinetics of synthesis and turnover of the initiation sequence. *J. Mol. Biol.*, **119**, 49-68.

Bogenhagen, D., & Clayton, D. A. (1977) Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell*; **11**, 719-27.

Bonnefoy, E., Takahashi, M., & Yaniv, J. R. (1994) DNA-binding parameters of the HU protein of *Escherichia coli* to cruciform DNA. *J Mol Biol*; **242**, 116-29.

Bois, P., & Jeffreys, A. J. (1999) Minisatellite instability and germline mutation. *Cell Mol Life Sci*; **55**, 1636-48.

Boubrick, F., & Rouvière-Yaniv, J. (1995) Increased sensitivity to gamma irradiation in bacteria lacking protein HU. *Proc Natl Acad Sci USA*; **92**, 3958-62.

Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M. D., & Goodman, M. F. (2003) Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc Natl Acad Sci USA*; **100**, 4102-7.

Broccoli, S., Rallu, F., Sanscartier, P., Cerritelli, S. M., Crouch, R. J., & Drolet, M. (2004) Effects of RNA polymerase modifications on transcription-induced negative supercoiling and associated R-loop formation. *Mol Microbiol*; **52**, 1769-79.

Broccoli, S., Phoenix, P., & Drolet, M. (2000) Isolation of the *topB* gene as a multicopy suppressor of *topA* null mutations in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **35**, 58-68.

Brown, P. O., & Cozzarelli, N. R. (1981) Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **78**, 843-7.

Brown, P. O., Peebles, C. L., & Cozzarelli, N. R. (1979) A topoisomerase from *Escherichia coli* related to DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci USA*; **76**, 6110-4.

Broyles, S. S., & Pettijohn, D. E. (1986) Interaction of the *Escherichia coli* HU protein with DNA. Evidence for formation of nucleosome-like structures with altered DNA helical pitch. *J Mol Biol*; **187**, 47-60.

Buhler, C., Gadelle, D., Forterre, P., Wang, J. C., & Bergerat, A. (1998) Reconstitution of DNA topoisomerase VI of the thermophilic archaeon *Sulfolobus*

shibatae from subunits separately overexpressed in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*; **26**, 5157-62.

Castaing, B., Zelwer, C., Laval, J., & Boiteux, S. (1995) HU protein of *Escherichia coli* binds specifically to DNA that contains single-strand breaks or gaps. *J Biol Chem*; **270**, 10291-6.

Chan, P. T., Ohmori, H., Tomizawa, J., & Lebowitz, J. (1985) Nucleotide sequence and gene organization of ColE1 DNA. *J Biol Chem*; **260**, 8925-35.

Chatterji, M., Sengupta, S., & Nagaraja, V. (2003) Chromosomally encoded gyrase inhibitor GyrI protects *Escherichia coli* against DNA-damaging agents. *Arch Microbiol*; **180**, 339-46.

Chatterji, M., & Nagaraja, V. (2002) GyrI: a counter-defensive strategy against proteinaceous inhibitors of DNA gyrase. *EMBO Rep*; **3**, 261-7.

Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, RT., Datta, A., Manis, J., & Alt, FW. (2007) Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv Immunol*; **94**, 157-214.

Chaudhuri, J; Khuong, C., & Alt, F. W. (2004) Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature*; **430**, 992-8.

Chaudhuri, J., & Alt, F. W. (2004) Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):541-52. Erratum in: *Nat Rev Immunol*. 2004 Aug;4(8):655.

Chávez, S; Garcia-Rubio, M; Prado, F., & Aguilera, A. (2001) Hpr1 is preferentially required for transcription of either long or G+C-rich DNA sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*; **21**, 7054-64.

Chávez, S., Beilharz, T., Rondón, A. G., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Svejstrup, J. Q., Lithgow, T., & Aguilera, A. (2000) A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*; **19**, 5824-34.

Chávez, S., & Aguilera, A. (1997) The yeast *HPRI* gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability. *Genes Dev*; **11**, 3459-70.

Chen, D., Bowater, R., & Lilley, D. M. (1994) Topological promoter coupling in *Escherichia coli*: *AtopA*-dependent activation of the leu-500 promoter on a plasmid. *J Bacteriol*; **176**, 3757-64.

Cheng, B., Zhu, C. X., Ji, C., Ahumada, A., & Tse-Dinh, Y. C. (2003a) Direct interaction between *E. coli* RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, **278**, 30705-10.

Cheng, B., Rui, S., Ji, C., Gong, V. W., Van Dyk, T. K., Drolet, M., & Tse-Dinh, Y. C. (2003b). RNase HI overproduction allows the expression of stress-induced genes in the absence of topoisomerase I. *FEMS Microbiol. Lett.*, **221**, 237-242.

Clayton, D. A. (1992) Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int. Rev. Cytol.* **141**, 217-232.

Cozzarelli, N. R., Cost, G. J., Nöllmann, M., Viard, T., & Stray, J. E. (2006) Giant proteins that move DNA: bullies of the genomic playground. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **7**, 580-8.

Daniels, G. A., & Lieber, M. R. (1995) RNA: DNA complex formation upon transcription of immunoglobulin switch regions: implications for the mechanism and regulation of class switch recombination. *Nucleic Acids Res.* **23**, 5006-11.

De Massy, B., Fayet, O., & Kogoma, T. (1984) Multiple origin usage for DNA replication in *sdrA* (*rnhA*) mutants of *Escherichia coli* K-12 : initiation in the absence of *oriC*. *J. Mol. Biol.*, **178**, 227-236.

Dempsey, L. A; Sun, H; Hanakahi, L. A., & Maizels, N. (1999) G4 DNA binding by LR1 and its subunits, nucleolin and hnRNP D, A role for G-G pairing in immunoglobulin switch recombination. *J Biol Chem*; **274**, 1066-71.

Dean, F. B., Krasnow, M. A., Otter, R., Matzuk, M. M., Spengler, S. J., & Cozzarelli, N. R. (1983) *Escherichia coli* type-1 topoisomerases: identification, mechanism, and role in recombination. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; **2**, 769-77.

Deng, S., Stein, R. A., & Higgins, N. P. (2005) Organization of supercoil domains and their reorganization by transcription. *Mol Microbiol*; **57**, 1511-21.

Digate, R. J., & Marians, K. J. (1988) Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 13366-13373.

Digate, R. J., & Marians, K. J. (1989) Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli topB*, the gene encoding topoisomerase III. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17924-17930.

DiNardo, S., Voelkel, K. A., Sternglanz, R., Reynolds, A. E., & Wright, A. (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomérase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell.*, **31**, 43-51.

Donoghue, D. J., & Sharp, P. A. (1978) Replication of colicin E1 plasmid DNA *in vivo* requires no plasmid-encoded proteins. *J Bacteriol*; **133**, 1287-94.

Dorman, C. J (2004) H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol*; **2**, 391-400.

Doublet, P., Van Heijenoort, J., Bohin, J. P., & Mengin-Lecreulx, D. (1993) The *murI* gene of *Escherichia coli* is an essential gene that encodes a glutamate racemase activity. *J Bacteriol*; **175**, 2970-9.

Doublet, P., Van Heijenoort, J., & Mengin-Lecreulx, D. (1992) Identification of the *Escherichia coli* *murI* gene, which is required for the biosynthesis of D-glutamic acid, a specific component of bacterial peptidoglycan. *J Bacteriol*; **174**, 5772-9.

Dougherty, T. J; Thanassi, J. A., & Pucci, M. J. (1993) The *Escherichia coli* mutant requiring D-glutamic acid is the result of mutations in two distinct genetic loci. *J Bacteriol*; **175**, 111-6.

Drlica, K., Hiasa, H., Kerns, R., Malik, M., Mustaev, A., & Zhao, X. (2009) Quinolones: Action and Resistance Updated. *Curr Top Med Chem*; Epub ahead of print]

Drlica, K. (1992) Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.*, **6**, 645-433.

Drlica, K., & Rouviere-Yaniv, J. (1987) Histonelike proteins of bacteria. *Microbiol rev*; **51**, 301-19.

Drlica, K., & Snyder, M. (1978) Superhelical *Escherichia coli* DNA : relaxation by coumermycin. *J. Mol. Biol.*, **120**, 145-154.

Dröge, P., & Nordheim, A. (1991) Transcription-induced conformational change in a topologically closed DNA domain. *Nucleic Acids Res*; **19**, 2941-6.

Drolet, M. (2006) Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol Microbiol*; **59**, 723-30.

Drolet, M., Broccoli, S., Rallu, F., Hraiky, C., Fortin, C., Massé, E., & Baaklini, I. (2003) The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front. Biosci.*, **8**, 210-221.

Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, É., Liu, L. F., & Crouch, R. J. (1995) Overexpression of RNase HI partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* $\Delta topA$ mutant : R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomérase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 3526-3530.

Drolet, M., Bi, X., & Liu, L. F. (1994) Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2068-2074.

Du, S. M., Wang, H., Tse-Dinh, Y. C., & Seeman, N. C. (1995) Topological transformations of synthetic DNA knots. *Biochemistry*; **34**, 673-82.

Duquette, M. L., Pham, P., Goodman, M. F., & Maizels, N. (2005) AID binds to transcription-induced structures in c-MYC that map to regions associated with translocation and hypermutation. *Oncogene*; **24**, 5791-8.

Duquette, M. L., handa, P., Vincent, J. A., Taylor, A. F., & Maizels, N. (2004) Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Genes Dev*; **18**, 1618-29.

Espeli, O., Nurse, P., Levine, C., Lee, C., & Mariani, K. J. (2003) SetB: an integral membrane protein that affects chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*; **50**, 495-509.

Fan, H. Y., & Klein, H. L. (1994) Characterization of mutations that suppress the temperature-sensitive growth of the *hpr1* delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*; **137**, 945-56.

Fan, H. Y., Merker, R. J., & Klein, H. L. (2001) High-copy-number expression of Sub2p, a member of the RNA helicase superfamily, suppresses *hpr1*-mediated genomic instability. *Mol Cell Biol*; **21**, 5459-70.

Fernández-Silva, P., Enriquez, J. A., & Montoya, J. (2003) Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol*; **88**, 41-56.

Firshein, W., Strumph, P., Benjamin, P., Burnstein, K., & Kornacki, K. (1982) Replication of a low-copy-number plasmid by a plasmid DNA-membrane complex extracted from minicells of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*; **150**, 1234-43.

Free, A., & Dorman, C. J. (1994) *Escherichia coli tyrT* gene transcription is sensitive to DNA supercoiling in its native chromosomal context : effect of DNA topoisomerase IV overexpression on *tyrT* promoter function. *Mol. Microbiol.*, **14**, 151-161.

Funnel, B. E., Baker, T. A., & Kornberg, A. (1987) *In vitro* assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.*, **262**, 10327-10334.

Funnell, B. E., Baker, T. A., & Kornberg, A. (1986) Complete enzymatic replication of plasmids containing the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.*, **261**, 5616-5624.

Gamper, H. B., & Hearst, J. E. (1982) A topological model for transcription based on unwinding angle analysis of *E. coli* RNA polymerase binary, initiation and ternary complexes. *Cell*; **29**, 81-90.

Ge, H., & Manley, J. L. (1990) A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA *in vitro*. *Cell*; **62**, 25-34.

Gellert, M., O'Dea, K., Mizuuchi, K., & Nash, H. (1976) DNA gyrase : an enzyme that introduces superhelical turns into DNA, *Proc. Natl. Sci. USA.*, **73**, 3872-3876.

Goodrich, J. A., Schwartz, M. L., & McClure, W. R. (1990) Searching for and predicting the activity of sites for DNA binding proteins: compilation and analysis of the binding sites for *Escherichia coli* integration host factor (IHF). *Nucleic Acids Res*; **18**, 4993-5000.

Graveley, B. R. (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*; **6**, 1197-211.

Griffith, J. D. (1976) Visualization of prokaryotic DNA in a regulatory condensed chromatin-like fiber. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 563-567.

Hardy, C. D., & Cozzarelli N. R. (2005) A genetic selection for supercoiling mutants of *Escherichia coli* reveals proteins implicated in chromosome structure. *Mol Microbiol.*, **57**, 1636-52.

Harmon, F. G., Brockman, J. P., & Kowalczykowski, S. C. (2003) RecQ helicase stimulates both DNA catenation and changes in DNA topology by topoisomerase III. *J Biol Chem*; **278**, 42668-78.

Harmon, F. G., DiGate, R. J., & Kowalczykowski, S.C. (1999) RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination. *Mol Cell*; **3**, 611-20.

Hartsuiker, E., Bähler, J., & Kohli J. (1998) The role of topoisomerase II in meiotic chromosome condensation and segregation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*; **9**, 2739-50.

Hatfield, G. W., & Benham, C. F (2002) DNA topology-mediated control of global gene expression in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet*; **36**, 175-203.

Heisig, P. (1996) Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*; **40**, 879-85.

Hiasa, H., & Shea, M. E. (2000) DNA gyrase-mediated wrapping of the DNA strand is required for the replication fork arrest by the DNA gyrase-quinolone-DNA ternary complex. *J Biol Chem*; **275**, 34780-6.

Hiasa, H., & Marians, K. J. (1996) Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication. *Biol Chem*; **271**, 21529-35.

Hiasa, H., DiGate, R. J., & Marians, K.J. (1994) Decatenating activity of *Escherichia coli* DNA gyrase and topoisomerases I and III during *oriC* and pBR322 DNA replication in vitro. *J Biol Chem*; **269**, 2093-9.

Hiasa, H., & Marians, K. J. (1994) Topoisomerase III, but not topoisomerase I, can support nascent chain elongation during theta-type DNA replication. *J Biol Chem*; **269**, 32655-9.

Higgins, N.P., Deng, S., Pang, Z., Stein, R., Champion, K., & Manna, D. (2005) Domain behavior and supercoil dynamics in bacterial chromosomes. *The Bacterial Chromosome* Higgins, N.P. (ed.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 133–153.

Hillenbrand, G., & Staudenbauer, W. L. (1982) Discriminatory function of ribonuclease H in the selective initiation of plasmid DNA replication. *Nucleic Acids Res*; **10**, 833-53

Hillyard, D. R., Edlund, M., Hughes, K. T., Marsh, M., & Higgins, N. P (1990) Subunit-specific phenotypes of *Salmonella typhimurium* HU mutants. *J Bacteriol*; **172**, 5402-7.

Hooper, D. C. (1999) Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat*; **2**, 38-55

Hraiky, C., Raymond, M. A., & Drolet, M. (2000) RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*; **275**, 11257-63.

Huang, F. T., Yu, K., Balter, B. B., Selsing, E., Oruc, Z., Khamlichi, A. A., Hsieh, C. L., & Lieber, M. R. (2007) Sequence dependence of chromosomal R-loops at the immunoglobulin heavy-chain Smu class switch region. *Mol Cell Biol*; **27**, 5921-32.

Huang, F.T., Yu, K., Hsieh, C.L., & Lieber, M. R. (2006) Downstream boundary of chromosomal R-loops at murine switch regions : Implications for the mechanism of class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*; **103**, 5030-5.

Huang, Y., & Steitz, J. A. (2005) SRprises along a messenger's journey. *Mol Cell*; **17**, 613-5.

Huertas, P., & et Aguilera, A. (2003) Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol Cell*; **12**, 711-21.

Iost, I., & Dreyfus, M. (1995) The stability of *Escherichia coli* lacZ mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO J*; **14**, 3252-61.

Itoh ,T., & Tomizawa, J. (1980) Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. *Proc Natl Acad Sci USA*; **77**, 2450-4.

Itoh, T., & Tomizawa, J. I. (1979) Initiation of replication of plasmid ColE1 DNA by RNA polymerase,

Jimeno, S., Rondón, A. G., Luna, R., & Aguilera, A. (2002) The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *EMBO J*; **21**, 3526-35.

Jove, R., & Manley, J. L. (1984) *In vitro* transcription from the adenovirus 2 major late promoter utilizing templates truncated at promoter-proximal sites. *J Biol Chem*; **259**, 8513-21.

Kaidow, A., Wachi, M., Nakamura, J., Magae, J., & Nagai, K. (1995) Anucleate cell production by *Escherichia coli* Δhns mutant lacking a histone-like protein, H-NS. *J Bacteriol*; **177**, 3589-92.

Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., & Suzuki, H. (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell*; **63**, 393-404. Erratum in: *Cell* 1991 Jun 28; 65(7):1289.

Kavenoff, R., & Bowen, B. C. (1976) Electron microscopy of membrane-free folded chromosomes from *Escherichia coli*. *Chromosoma*; **59**, 89-101.

Keck, J. L., & Berger, J. M. (1999) Enzymes that push DNA around. *Nat Struct Biol*; **6**, 900-2.

Khodursky, A. B; Peter, B.J; Schmid, M. B; DeRisi, J; Botstein, D; Brown, P. O., & Cozzarelli, N. R. (2000) Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA*; **97**, 9419-24.

Khodursky, A. B., & Cozzarelli, N. R. (1998) The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J Biol Chem*; **273**, 27668-77.

Kirkegaard, K., & Wang, J. C. (1985) Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *J Mol Biol*; **185**, 625-37.

Kogoma, T. (1994) Escherichia coli RNA polymerase mutants that enhance or diminish the SOS response constitutively expressed in the absence of RNase HI activity. *J Bacteriol*; **176**, 1521-3.

Kogoma, T., Hong, X., Cadwell, G. W., Barnard, K. G., & Asai, T. (1993) Requirement of homologous recombination functions for viability of the *Escherichia coli* cell that lacks RNase HI and exonuclease V activities. *Biochimie*; **75**, 89-99.

Kogoma, T., Skarstad, K., Boye, E., Von Meyenburg, K., & Steen HB. (1985a) RecA protein acts at the initiation of stable DNA replication in *rnh* mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*; **163**, 439-44.

Kogoma, T., Subia, N. L., & Von Meyenburg, K. (1985b) Function of ribonuclease H in initiation of DNA replication in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet*; **200**, 103-9.

Kogoma, T., & Von Meyenburg, K. (1983) The origin of replication, *oriC*, and the *dnaA* protein are dispensable in stable DNA replication (*sdrA*) mutants of *Escherichia coli* K-12. *EMBO J*; **2**, 463-8.

Kogoma, T. (1978) A novel *Escherichia coli* mutant capable of DNA replication in the absence of protein synthesis. *J Mol Biol*; **121**, 55-69.

Kornberg, T., Lockwood, A., & Worcel, A. (1974) Replication of the *Escherichia coli* chromosome with a soluble enzyme system. *Proc Natl Acad Sci USA*; **71**, 3189-93.

Kouzminova, E. A., Rotman, E., Macomber, L., Zhang, J., & Kuzminov, A. (2004) RecA-dependent mutants in *Escherichia coli* reveal strategies to avoid chromosomal fragmentation. *Proc Natl Acad Sci USA*; **101**, 16262-7.

Krainer, A. R., Conway, G. C., & Kozak, D. (1990a) The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites. *Cell*; **62**, 35-42.

Krainer, A. R., Conway, G. C., & Kozak, D. (1990b) Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes Dev*; **4**, 1158-71.

Krasilnikova, M. M., Samadashwily, G. M., Krasilnikov, A. S., & Mirkin, S. M. (1998) Transcription through a simple DNA repeat blocks replication elongation. *EMBO J*; **17**, 5095-102.

Krasilnikov, A. S., Podtelezhnikov, A., Vologodskii, A., & Mirkin, S. M. (1999) Large-scale effects of transcriptional DNA supercoiling *in vivo*. *J Mol Biol*; **292**, 1149-60.

Kubo, M., Kano, Y., Nakamura, H., Nagata, A., & Imamoto, F. (1979) *In vivo* enhancement of general and specific transcription in *Escherichia coli* by DNA gyrase activity. *Gene*; **7**, 153-71.

Kumagai, Y., Kato, J. I., Hoshino, K., Akasaka, T., Sato, K., & Ikeda, K. (1996) Quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV parC gene. *Antimicrob Agents Chemother*; **40**, 710-14.

Kushner, S. R. (2002) mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. *J Bacteriol*; **184**, 4658-65.

Lee, D. Y., & Clayton, D. A. (1996) Properties of a primer RNA-DNA hybrid at the mouse mitochondrial DNA leading-strand origin of replication. *J Biol Chem*; **271**, 24262-9.

Lemaire, R., Prasad, J., Kashima, T., Gustafson, J., Manley, J. L., & Lafyatis, R. (2002) Stability of a PKCI-1-related mRNA is controlled by the splicing factor ASF/SF2: a novel function for SR proteins. *Genes Dev*; **16**, 594-607

Leng, F., Amado, L., & McMacken, R. (2004) Coupling DNA supercoiling to transcription in defined protein systems. *J Biol Chem*; **279**, 47564-71.

Leng, F., & McMacken, R. (2002) Potent stimulation of transcription-coupled DNA supercoiling by sequence-specific DNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*; **99**, 9139-44.

Lewicki, B. T., Margus, T., Remme, J., & Nierhaus, K. H. (1993) Coupling of rRNA transcription and ribosomal assembly *in vivo*. Formation of active ribosomal subunits in *Escherichia coli* requires transcription of rRNA genes by host RNA polymerase which cannot be replaced by bacteriophage T7 RNA polymerase. *J Mol Biol*; **231**, 581-93.

Li, X., & Manley, J. L. (2005a) New talents for an old acquaintance: the SR protein splicing factor ASF/SF2 functions in the maintenance of genome stability. *Cell Cycle*; **4**, 1706-8.

Li, X., & Manley, J. L. (2005b) Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell*; **122**, 365-78.

Liu, L. F., & Wang, J. C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*; **84**, 7024-7.

Liu, L. F., Liu, C. C., & Alberts, B. M. (1980) Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. *Cell*; **19**, 697-707.

Liu, L. F., & Wang, J. C. (1978) DNA-DNA gyrase complex: the wrapping of the DNA duplex outside the enzyme. *Cell*; **15**, 979-84.

Lockshon, D., & Morris, D. R. (1983) Positively supercoiled plasmid DNA is produced by treatment of *Escherichia coli* with DNA gyrase inhibitors. *Nucleic Acids Res*; **11**, 2999-3017.

Lodge, J. K., Kazic, T., & Berg, D. E. (1989) Formation of supercoiling domains in plasmid pBR322. *J Bacteriol*; **171**, 2181-7.

Loewen, P. C., & Hengge-Aronis, R. (1994) The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu Rev Microbiol*; **48**, 53-80.

Lopez, C. R., Yang, S., Deibler, R. W., Ray, S. A., Pennington, J. M., Digate, R. J., Hastings, P. J., Rosenberg, S. M., & Zechiedrich, E. L. (2005) A role for topoisomerase III in a recombination pathway alternative to RuvABC. *Mol Microbiol*; **58**, 80-101.

Lynch, A. S., & Wang, J. C. (1993) Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *J Bacteriol*; **175**, 1645-55.

Malik, M., Bensaid, A., Rouviere-Yaniv, J., & Drlica, K. (1996) Histone-like protein HU and bacterial DNA topology: suppression of an HU deficiency by gyrase mutations. *J Mol Biol*; **256**, 66-76.

Manley, J. L., & Tacke, R. (1996) SR proteins and splicing control. *Genes Dev*; **10**, 1569-79.

Marians, K. J. (1987) DNA gyrase-catalyzed decatenation of multiply linked DNA dimers. *J Biol Chem*; **262**, 10362-8.

Marians, K. J., Minden, J.S., & Parada, C. (1986) Replication of superhelical DNAs *in vitro*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*; **33**, 111-40.

Martínez-robles, M. L., Witz, G., Hernández, P., Schwartzman, J. B., Stasiak, A., & Krimer, D. B. (2009) Interplay of DNA supercoiling and catenation during the segregation of sister duplexes. *Nucleic Acids Res*; **37**, 5126-37.

Massé, E., Phoenix, P., & Drolet, M. (1997) DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*; **272**, 12816-23.

Massé, E., & Drolet, M. (1999a) Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*; **274**, 16654-8.

Massé, E., & Drolet, M. (1999b) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem*; **274**, 16659-64.

Massé, E., & Drolet, M. (1999c) R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli topA* mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J Mol Biol*; **294**, 321-32.

Masuda, Y., & Ohtsubo, E. (1994) Mapping and disruption of the *chpB* locus in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*; **176**, 5861-3.

Masukata, H., & Tomizawa, J. (1986). Control of primer formation for ColE1 plasmid replication: conformational change of the primer transcript. *Cell*; **44**, 125-36.

Masukata, H., & Tomizawa, J. (1984) Effects of point mutations on formation and structure of the RNA primer for ColE1 DNA replication. *Cell*; **36**, 513-22.

Maxwell, A., Costenaro, L., Mittelheiser, S., & Bates, A. D. (2005) Coupling ATP hydrolysis to DNA strand passage in type IIA DNA topoisomerases. *Biochem Soc Trans*; **33**, 1460-4.

McCool, J. D., Long, E., Petrosino, J. F., Sandler, H. A., Rosenberg, S. M., & Sandler, S. J. (2004) Measurement of SOS expression in individual *Escherichia coli* K-12 cells using fluorescence microscopy. *Mol Microbiol*; **53**, 1343-57.

McEachern, F., & Fisher, L. M. (1989) Regulation of DNA supercoiling in *Escherichia coli*: genetic basis of a compensatory mutation in DNA gyrase. *FEBS Lett*; **253**, 67-70.

McGlynn, P., & Lloyd, R. G. (2002) Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **3**, 859-70.

Menzel, R., & Gellert, M. (1983) Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell*; **34**, 105-13.

Michel, B., Boubakri, H., Baharoglu, Z., LeMasson, M., & Lestini, R. (2007) Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair (Amst)*; **6**, 967-80.

Minden, J. S., & Marians, K. J. (1985) Replication of pBR322 DNA *in vitro* with purified proteins. Requirement for topoisomerase I in the maintenance of template specificity. *J Biol Chem*; **260**, 9316-25

Mirkin, S. M., & Shmerling, Zh. G. (1982) DNA replication and transcription in a temperature-sensitive mutant of *E. coli* with a defective DNA gyrase B subunit. *Mol Gen Genet*; **188**, 91-5.

Mizumoto, K., & Kaziyo, Y. (1987) Messenger RNA capping enzymes from eukaryotic cells. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*; **34**:1-28.

Mizuta, R., Mizuta, M., & Kitamura, D. (2005) Guanine is indispensable for immunoglobulin switch region RNA-DNA hybrid formation. *J Electron Microsc (Tokyo)*; **54**, 403-8.

Mizuuchi, K., Fisher, L. M., O'Dea, M. H., & Gellert, M. (1980) DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*; **77**, 1847-51.

Mizuuchi, K., Gellert, M., & Nash, H. A. (1978) Involvement of supertwisted DNA in integrative recombination of bacteriophage lambda. *J Mol Biol*; **121**, 375-92.

Murphy, L. D., & Zimmerman, S. B. (1997a) Isolation and characterization of spermidine nucleoids from *Escherichia coli*. *J Struct Biol*; **119**, 321-35.

Murphy, L. D., & Zimmerman, S. B. (1997b) Stabilization of compact spermidine nucleoids from *Escherichia coli* under crowded conditions: implications for *in vivo* nucleoid structure. *J Struct Biol*; **119**, 336-46.

Nakamura, S., Nakamura, M., Kojima, T., & Yoshida, H. (1989) *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*; **33**, 254-5.

Nakanishi, A., Oshida, T., Matsushita, T., Imajoh-Ohmi, S., & Ohnuki, T. (1998) Identification of DNA gyrase inhibitor (GyrI) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*; **273**, 1933-8.

Nash, H. A. (1990) Bending and supercoiling of DNA at the attachment site of bacteriophage lambda. *Trends Biochem Sci*; **15**, 222-7.

Neidle, S., & Parkinson, G. N. (2003) The structure of telomeric DNA. *Curr Opin Struct Biol*; **13**, 275-83.

Nichols, M. D., DeAngelis, K., Keck, J. L., & Berger, J. M. (1999) Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *EMBO J*; **18**, 6177-88.

Nöllmann, M., Crisona, N. J., & Arimondo, P. B (2007) Thirty years of *Escherichia coli* DNA gyrase: from *in vivo* function to single-molecule mechanism. *Biochimie*; **89**, 490-9.

Nurse, P., Levine, C., Hassing, H., & Marians, K. J. (2003) Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*; **278**, 8653-60.

Oblak, M., Kotnik, M., & Solmajer, T. (2007) Discovery and development of ATPase inhibitors of DNA gyrase as antibacterial agents. *Curr Med Chem*; **14**, 2033-47.

Oh, T. J., Jung, I. L., & Kim, I. G. (2001) The *Escherichia coli* SOS gene *sbmC* is regulated by H-NS and RpoS during the SOS induction and stationary growth phase. *Biochem Biophys Res Commun*; **288**, 1052-8.

Ohmori, H., Murakami, Y., & Nagata, T. (1987) Nucleotide sequences required for a ColE1-type plasmid to replicate in *Escherichia coli* cells with or without RNase H. *J Mol Biol*; **198**, 223-34.

Ogata, Y., Inoue, R., Mizushima, T., Kano, Y., Miki, T., & Sekimizu, K. (1997) Heat shock-induced excessive relaxation of DNA in *Escherichia coli* mutants lacking the histone-like protein HU. *Biochim Biophys Acta*; **1353**, 298-306.

Ogawa, T., & Okazaki, T. (1984) Function of RNase H in DNA replication revealed by RNase H defective mutants of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*; **193**, 231-7.

Ogawa, T., Pickett, G. G., Kogoma, T., & Kornberg, A. (1984) RNase H confers specificity in the dnaA-dependent initiation of replication at the unique origin of the *Escherichia coli* chromosome *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*; **81**, 1040-4.

Oram, M., & Fisher, L. M. (1992) An *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutant has a compensatory mutation that alters two residues between functional domains of the DNA gyrase A protein. *J Bacteriol*; **174**, 4175-8.

Orphanides, G., & Maxwell, A. (1994) Evidence for a conformational change in the DNA gyrase-DNA complex from hydroxyl radical footprinting. *Nucleic Acids Res*; **22**, 1567-75

Orr, E., & Staudenbauer, W. L. (1981) An *Escherichia coli* mutant thermosensitive in the B subunit of DNA gyrase: effect on the structure and replication of the colicin E1 plasmid *in vitro*. *Mol Gen Genet*; **181**, 52-6.

Osheroff, N., Shelton, E. R., & Brutlag, D. L. (1983) DNA topoisomerase II from *Drosophila melanogaster*. Relaxation of supercoiled DNA. *J Biol Chem*; **258**, 9536-43.

Pan, C. Q., Finkel, S. E., Cramton, S. E., Feng, J. A., Sigman, D. S., & Johnson, R. C. (1996) Variable structures of Fis-DNA complexes determined by flanking DNA-protein contacts. *J Mol Biol*; **264**, 675-95.

Parkinson, G. N., Lee, M. P., & Neidle, S. (2002) Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature*; **417**,876-80.

Peebles, C. L., Higgins, N. P., Kreuzer, K. N., Morrison, A., Brown, P. O., Sugino, A., & Cozzarelli, N. R. (1979) Structure and activities of *Escherichia coli* DNA gyrase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 43 Pt 1:41-52.

Peng, H., & Marians, K. J. (1993) *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J Biol Chem*; **268**, 24481-90.

Peter, B. J., Ullsperger, C., Hiasa, H., Marians, K. J., & Cozzarelli, N. R. (1998) The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell*; **94**,819-27.

Petersen-Mahrt, S. K., Harris, R. S., & Neuberger, M. S. (2002) AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature*; **18**, 99-103.

Pettijohn, D. E. (1996) The nucléoïde. In *Escherichia coli and Salmonella*, Vol.1. Neidhardt, F. C. (ed.). Washington, DC : American Society for Microbiology Press, pp158-166.

Phoenix, P., Raymond, M. A., Massé, E & Drolet, M. (1997) Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J Biol Chem*; **272**, 1473-9.

Piruat, J. I., & Aguilera, A. (1998) A novel yeast gene, THO2, is involved in RNA pol II transcription and provides new evidence for transcriptional elongation-associated recombination. *EMBO J*; **17**, 4859-72.

Pontiggia, A., Negri, A., Beltrame, M., & Bianchi, M. E. (1993) Protein HU binds specifically to kinked DNA. *Mol Microbiol*; **7**, 343-50.

Postow, L., Hardy, C. D., Arsuaga, J., & Cozzarelli, N. R. (2004) Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev*; **18**, 1766-79.

Pradella, S., Hans, A., Spröer, C., Reichenbach, H., Gerth, K., & Beyer, S. (2002) Characterisation, genome size and genetic manipulation of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56. *Arch Microbiol*; **178**, 484-92.

Prado, F., Piruat, J. I., & Aguilera, A. (1997) Recombination between DNA repeats in yeast *hpr1Δ* cells is linked to transcription elongation. *EMBO J*; **16**, 2826-35.

Pruss, G. J., & Drlica, K. (1989) DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell*; **56**, 521-3.

Pruss, G. J., & Drlica, K. (1986) Topoisomerase I mutants: the gene on pBR322 that encodes resistance to tetracycline affects plasmid DNA supercoiling. *Proc Natl Acad Sci USA*; **83**, 8952-6.

Pruss, G. J. (1985) DNA topoisomerase I mutants. Increased heterogeneity in linking number and other replicon-dependent changes in DNA supercoiling. *J Mol Biol*; **185**, 51-63.

Pruss, G. L., Manes, S. H., & Drlica, K. (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell*; **31**, 35-42.

Rahmouni, A. R., & Wells, R. D. (1992) Direct evidence for the effect of transcription on local DNA supercoiling in vivo. *J Mol Biol*; **223**, 131-44.

Raji, A., Zabel, D. J., Laufer, C. S., & Depew, R. E. (1985) Genetic analysis of mutations that compensate for loss of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J Bacteriol*; **162**, 1173-9.

Rasmussen, E. B., & Lis, J. T. (1993) *In vivo* transcriptional pausing and cap formation on three *Drosophila* heat shock genes. *Proc Natl Acad Sci USA*; **90**, 7923-7.

Reaban, M. E., Lebowitz, J., & Griffin, J. (1994) Transcription induces the formation of a stable RNA-DNA hybrid in the immunoglobulin alpha switch region. *J Biol Chem*; **269**, 21850-7.

Reaban, M. E., & Griffin, J. A. (1990) Induction of RNA-stabilized DNA conformers by transcription of an immunoglobulin switch region. *Nature*; **348**, 342-4.

Redinbo, M. R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J. J., & Hol, W. G. (1998) Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science*; **279**, 1504-13.

Roberts, R. W., & Crothers, D. M. (1992) Stability and properties of double and triple helices: dramatic effects of RNA or DNA backbone composition. *Science*; **258**, 1463-6.

Roca, J. (1995) The mechanisms of DNA topoisomerases. *Trends Biochem Sci*; **20**, 156-60.

Rondón, A. G., Jimeno, S., Garcia-Rubio, M., & Aguilera, A. (2003) Molecular evidence that the eukaryotic THO/TREX complex is required for efficient transcription elongation. *J Biol Chem*; **278**, 39037-43.

Roy, D., Yu, K., & Lieber, M. R. (2008) Mechanism of R-loop formation at immunoglobulin class switch sequences. *Mol Cell Biol*; **28**, 50-60.

Rui, S., & Tse-Dinh, Y. C. (2003) Topoisomerase function during bacterial responses to environmental challenge. *Front Biosci*. Jan 1;8:d256-63.

Sadoff, B. U., Health-Pagliuso, S., Castaño, I. B., Zhu, Y., Kieff, F. S., & Christman, M. F. (1995) Isolation of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* requiring DNA topoisomerase I. *Genetics*; **141**, 465-79.

Sanford, J. R., Gray, N. K., Beckmann, K., & Cáceres, J. F (2004) A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *GenesDev*; **18**, 755-68.

Sanford, J. R., Longman, D., & Cáceres, J. F. (2003) Multiple roles of the SR protein family in splicing regulation. *Prog Mol Subcell Biol*; **31**, 33-58.

Schneider, R., Travers, A., & Muskhelishvili, G (2000) The expression of the *Escherichia coli* *fis* gene is strongly dependent on the superhelical density of DNA. *Mol Microbiol*; **38**, 167-75.

Schneider, R., Travers, A., Kutateladze, T., & Muskhelishvili, G (1999) A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*; **34**, 953-64.

Schneider, R., Travers, A., & Muskhelishvili, G (1997) FIS modulates growth phase-dependent topological transitions of DNA in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*; **26**, 519-30.

Schofield, M. A., Agbunag, R., Michaels, M. L., & Miller, J. H. (1992) Cloning and sequencing of *Escherichia coli* *mutR* shows its identity to *topB*, encoding topoisomerase III. *J Bacteriol*; **174**, 5168-70

Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S. D., & Michel, B. (1998) RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell*; **95**, 419-30.

Selsing, E. (2006) Ig class switching: targeting the recombinational mechanism. *Curr Opin Immunol*; **18**, 249-54.

Selzer, G., & Tomizawa, J. I. (1982) Specific cleavage of the p15A primer precursor by ribonuclease H at the origin of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*; **79**, 7082-6.

Sen, D., & Gilbert, W. (1988) Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature*; **334**, 364-6.

Sengupta, S., & Nagaraja, V. (2008) Inhibition of DNA gyrase activity by *Mycobacterium smegmatis* MurI. *FEMS Microbiol Lett*; **279**, 40-7.

Sengupta, S., Shah, M., & Nagaraja, V. (2006) Glutamate racemase from *Mycobacterium tuberculosis* inhibits DNA gyrase by affecting its DNA-binding. *Nucleic Acids Res*; **34**, 5567-76.

Shadel, G. S., & Clayton, D. A. (1997) Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem*; **66**, 409-35.

Shampay, J., Szostak, J. W., & Blackburn, E. H. (1984) DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature*; **310**, 154-7.

Shimizu, A., & Honjo, T. (1984) Immunoglobulin class switching. *Cell*; **36**, 801-3.

Simmons, L. A., Breier, A. M., Cozzarelli, N. R., & Kaguni, J. M (2004) Hyperinitiation of DNA replication in *Escherichia coli* leads to replication fork collapse and inviability. *Mol Microbiol*; **51**, 349-58.

Sinden, R. R. (1994) « DNA Structure and Function », *Academic Press*, San Diego, California.

Smith, C. L., Kubo, M., & Imamoto, F. (1978) Promoter-specific inhibition of transcription by antibiotics which act on DNA gyrase. *Nature*; **275**, 420-3.

- Snyder, L., & Champness, W** (1997) Molecular Genetics of Bacteria. *ASM Press*.
- Sonden, B., & Uhlin, B. E.** (1996) Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. *EMBO J*; **15**, 4970-80.
- Srivenugopal, K. S., Lockshon, D., & Morris, D. R.** (1984) *Escherichia coli* DNA topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme. *Biochemistry*; **23**, 1899-906.
- Staczek, P., & Higgins, N. P.** (1998) Gyrase and Topo IV modulate chromosome domain size in vivo. *Mol Microbiol*; **29**, 1435-48.
- Strässer, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A. G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., & Hurt, E.** (2002) TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature*; **417**, 304-8.
- Stupina, V. A., & Wang, J. C.** (2005) Viability of *Escherichia coli topA* mutants lacking DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*; **280**, 355-60.
- Sugino, A., Higgins, N. P., Brown, P. O., Peebles, C. L., & Cozzarelli, N. R.** (1978) Energy coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin. *Proc Natl Acad Sci USA*; **75**, 4838-42.
- Tashiro, J., Kinoshita, K., & Honjo, T.** (2001) Palindromic but not G-rich sequences are targets of class switch recombination. *Int Immunol*; **13**, 495-505.
- Tomizawa, J., & Masukata, H.** (1987) Factor-independent termination of transcription in a stretch of deoxyadenosine residues in the template DNA. *Cell*; **51**, 623-30.

Tomizawa, J., Itoh, T., Selzer, G., & Som, T. (1981) Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **78**, 1421-5.

Tomizawa, J. I., Ohmori, H., & Bird, R. E. (1977) Origin of replication of colicin E1 plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*; **74**, 1865-9.

Tomizawa, J. I., Sakakibara, Y., & Kakefuda, T. (1975) Replication of colicin E1 plasmid DNA added to cell extracts. *Proc Natl Acad Sci USA*; **72**, 1050-4

Tomizawa, J., Sakakibara, Y., & Kakefuda, T. (1974) Replication of colicin E1 plasmid DNA in cell extracts. Origin and direction of replication. *Proc Natl Acad Sci USA*; **71**, 2260-4.

Tous, C., & Aguilera, A. (2007) Impairment of transcription elongation by R-loops *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*; **360**, 428-32.

Travers, A., & Muskhelishvili, G. (2005a) Bacterial chromatin. *Curr Opin Genet Dev*; **15**, 507-17.

Travers, A., & Muskhelishvili, G. (2005b) DNA supercoiling - a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat Rev Microbiol*; **3**, 157-69.

Tsao, Y. P., Wu, H. Y., & Liu, F. L. (1989) Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from *in vitro* studies. *Cell*; **56**, 111-8.

Tse, Y., & Wang, J. C. (1980) *E. coli* and *M. luteus* DNA topoisomerase I can catalyze catenation of decatenation of double-stranded DNA rings. *Cell*; **22**, 269-76.

Tse-Dinh, Y. C. (1985) Regulation of the *Escherichia coli* DNA topoisomerase I gene by DNA supercoiling. *Nucleic Acids Res*; **13**, 4751-63.

Uematsu, N., Eda, S., & Yamamoto, K. (1997) An *Escherichia coli topB* mutant increases deletion and frameshift mutations in the *supF* target gene. *Mutat Res*; **383**, 223-30.

Usongo, V., Nolent, F., Sanscartier, P., Tanguay, C., Broccoli, S., Baaklini, I., Drlica, K., & Drolet, M. (2008) Depletion of RNase HI activity in *Escherichia coli* lacking DNA topoisomerase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation. *Mol Microbiol*; **69**, 968-98.

Viollier, P. H., Thanbichler, M., McGrath, P. T., West, L., Meewan, M., McAdams, H. H., & Shapiro, L. (2004) Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*; **101**, 9257-62.

Vologodskii, A., & Cozzarelli, N. R. (1996) Effect of supercoiling on the juxtaposition and relative orientation of DNA sites. *Biophys J*; **70**, 2548-56.

Von Meyenburg, K., Boye, E., Skarstad, K., Koppes, L., & Kogoma, T. (1987) Mode of initiation of constitutive stable DNA replication in RNase H-defective mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*; **169**, 2650-8.

Wada, M., Kano, Y., Ogawa, T., Okazaki, T., & Imamoto, F. (1988) Construction and characterization of the deletion mutant of *hupA* and *hupB* genes in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*; **204**, 581-91.

Wang, J. C. (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Reviews*; **3**, 430-440.

Wang, J. C. (1998) Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Q Rev Biophys*; **31**, 107-44.

Wang, J. C. (1996) DNA topoisomerases . *Ann Rev. Biochem*; **65**, 635-692.

- Wang, J. C.** (1985) DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*; **54**, 665-97.
- Wasserman, S. A., & Cozzarelli, N. R.** (1986) Biochemical topology: applications to DNA recombination and replication. *Science*; **232**, 951-60.
- Weinstein-Fischer, D., Elgrably-Weiss, M., & Altuvia, S.** (2000) *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide: a role for DNA supercoiling, topoisomerase I and Fis. *Mol Microbiol*; **35**, 1413-20.
- Westerhoff, H. V., O'Dea, M. H., Maxwell, A., & Gellert, M.** (1988) DNA supercoiling by DNA gyrase. A static head analysis. *Cell Biophys*; **12**, 157-81.
- Williams, A. B., & Foster, P. L.** (2007) The *Escherichia coli* histone-like protein HU has a role in stationary phase adaptive mutation. *Genetics*; **177**, 723-35.
- Wong, E. M., & Polisky, B.** (1985) Alternative conformations of the ColE1 replication primer modulate its interaction with RNA I. *Cell*; **42**, 959-66.
- Worcel, A., & Burgi, E.** (1972) On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*; **71**, 127-47.
- Wu, HY., Shyy, SH., Wang, J. C., & Liu, L. F.** (1988) Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*; **53**, 433-40.
- Xu, B., & Clayton, D. A.** (1996) RNA-DNA hybrid formation at the human mitochondrial heavy-strand origin ceases at replication start sites: an implication for RNA-DNA hybrids serving as primers. *EMBO J*; **15**, 3135-43.
- Xu, B., & Clayton, D. A.** (1995) A persistent RNA-DNA hybrid is formed during transcription at a phylogenetically conserved mitochondrial DNA sequence. *Mol Cell Biol*; **15**, 580-9.

Yigit, H., & Reznikoff, W. S. (1999) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I copurifies with Tn5 transposase, and Tn5 transposase inhibits topoisomerase I. *J Bacteriol*; **181**, 3185-92.

Yu, K., Roy, D., Huang, F. T., & Lieber, M. R (2006) Detection and structural analysis of R-loops. *Methods Enzymol*; **409**, 316-29.

Yu, K., Roy, D., Bayramyan, M., Haworth, I. S., & Lieber, M. R. (2005) Fine-structure analysis of activation-induced deaminase accessibility to class switch region R-loops. *Mol Cell Biol*; **25**, 1730-6.

Yu, K., Huang, F. T., & Lieber, M. R. (2004) DNA substrate length and surrounding sequence affect the activation-induced deaminase activity at cytidine. *J Biol Chem*; **279**, 6496-500.

Yu, K., & Lieber, M. R. (2003) Nucleic acid structures and enzymes in the immunoglobulin class switch recombination mechanism. *DNA Repair (Amst)*; **2**, 1163-74.

Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C. L., Wilson, T. E., & Lieber, M. R. (2003) R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat Immunol*; **4**, 442-51.

Zahradka, D., Vlahović, K., Petranović, M., & Petranović, D. (1999) Chromosome segregation and cell division defects in recBC sbcBC ruvC mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*; **181**, 6179-83.

Zechiedrich, E. L., Khodursky, A. B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D. M., & Cozzarelli, N. R. (2000) Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 8103-8113.

Zechiedrich, E. L., Khodursky, A. B., & Cozzarelli, N. R. (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev*; **11**, 2580-92.

Zechiedrich, E. L., & Cozzarelli, N. R. (1995) Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev*; **9**, 2859-69.

Zhang, Y., Zhu, L., Zhang, J., & Inouye, M. (2005) Characterization of ChpBK, an mRNA interferase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*; **280**, 26080-8.

Zhang, J., Zhang, Y., & Inouye, M. (2003) Characterization of the interactions within the mazEF addiction module of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*; **278**, 32300-6.

Zhang, A., & Belfort, M. (1992) Nucleotide sequence of a newly-identified *Escherichia coli* gene, *stpA*, encoding an H-NS-like protein. *Nucleic Acids Res*; **20**, 6735.

Zhao, X., Xu, C., Domalga, J., & Drlica, K. (1997) DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **94**, 13991-6.

Zhu, Q., Ponqpech, P., & DiGate, R. J. (2001) Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U. S. A*; **98**, 9766-71.

Zhu, Y., Peterson, C. L., & Christman, M. F. (1995) HPR1 encodes a global positive regulator of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*; **15**, 1698-708.

Références bibliographiques sur internet :

1. <http://www.llnl.gov/str/May04/DeYoreo.html>
2. <http://www.bentham.org/cmca/sample/cmca1-1/holden/holden-ms.html>
3. <http://openlearn.open.ac.uk>

V. Annexes

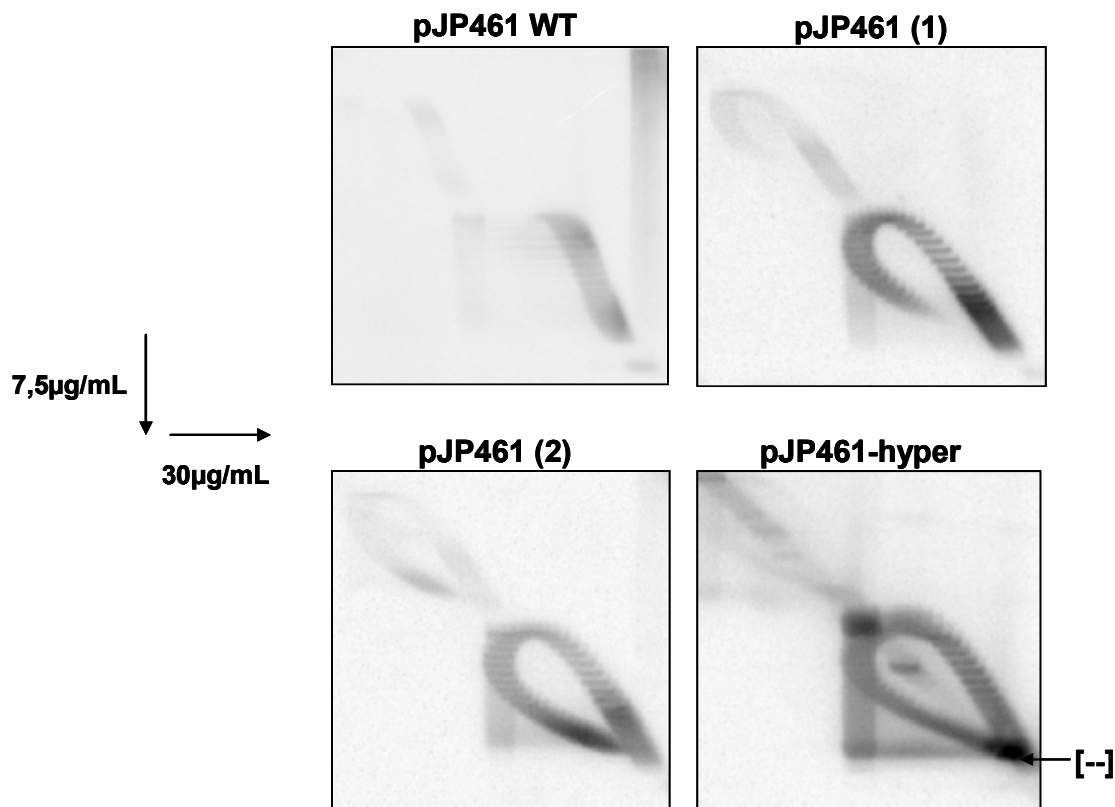


Figure 1 : Matrices d'ADN utilisées pour les transcriptions *in vitro*. Les matrices de densité de surenroulement variable ont été préparées à l'aide de bromure d'éthidium et de topoisomérase I. Les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose en présence de chloroquine à 7,5µg/mL pour la 1^{ère} dimension puis 30µg/mL pour la 2^{ème} dimension. Dans ces conditions, les topoisomères de densité de surenroulement plus élevée sont retrouvés au bas de la section gauche de la courbe alors que les plus relaxés se retrouvent en bas du côté droit. pJP461 WT indique le plasmide de densité de surenroulement sauvage. pJP461 (1) et (2) ont une densité de surenroulement intermédiaire entre le niveau sauvage et le niveau hypersurenroulé (pJP461-hyper).

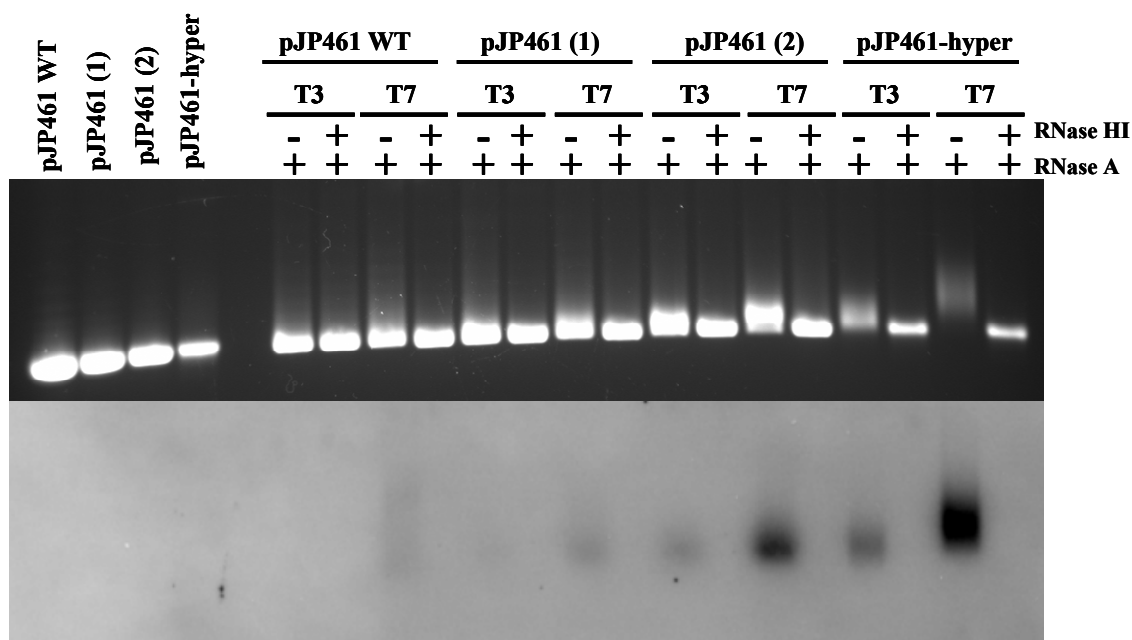


Figure 2 : Transcription *in vitro* de pJP461 avec différentes densités de surenroulement négatif. Chaque matrice a été transcrite dans son sens G-riche (T7) et dans son sens inverse (T3) avec ou sans RNase HI et en présence d'UTP radioactif. Après chaque transcription, tous les échantillons étaient finalement traités à la RNase A. Même si l'insertion d'UTP radioactif est aléatoire, l'intensité du signal reste proportionnelle à la longueur des R-loops. On peut voir ici que les R-loops se forment préférentiellement lorsque l'ADN transcrit est G-riche mais que le facteur principal influençant leur formation est la densité de surenroulement de la matrice.

VI. Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr. Marc Drolet pour m'avoir accepté au sein de son équipe et pour m'avoir fait confiance tout au long de ces années. Je tiens également à souligner sa totale disponibilité, chose que je n'ai pas souvent observée chez un directeur de recherche. Je lui suis aussi très reconnaissante de m'avoir guidé dans mon projet de recherche et de m'avoir encouragé à persévérer même quand le moral n'y était pas.

Au même titre, je tiens à remercier tous les autres membres du laboratoire, Cynthia Tanguay, Jill Harmony Egbe et Valentine Usongo pour leur esprit d'équipe, leur bonne humeur ainsi que pour leurs conseils judicieux. Je vous souhaite à tous d'aller au bout de vos rêves.

Je souhaiterais aussi particulièrement remercier Sonia Broccoli pour m'avoir formée aux différentes techniques lors de mon arrivée au laboratoire.

J'adresse également une spéciale dédicace à Jérémy Delesques pour sa persévérance, sa constante bonne humeur ainsi que pour son humour insolite. Je lui souhaite d'achever son doctorat avec succès.

J'ai une dette particulière envers mes complices et amis, Eddy, Violette, Iannick, Véronique, Imad, Pascal, Adrien et Pénélope pour leur joie de vivre et pour leur appui inconditionnel. Ils ont grandement facilité mon intégration au Québec. Je ne peux oublier également mon amie et partenaire de badminton Belinda pour nos merveilleux matchs de fin de journée ainsi qu'Hourya pour sa générosité et son délicieux couscous.

Je ne saurais clore cette page sans remercier ma famille. Malgré la distance qui nous sépare, elle m'a toujours été d'un grand soutien et m'a toujours encouragée dans les moments difficiles.

